Composiciones y Métodos para la Inducción de una Respuesta Inmune

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a inducción de respuestas inmunes, de manera adecuada, respuestas inmunes protectoras, frente a SARS-CoV2 (nC0V-19).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El coronavirus 19 (SARS-CoV2; a veces denominado nCoV-19 o COVID-19) es el virus responsable de un brote de enfermedad por coronavirus que se informó por primera vez desde Wuhan, China, el 31 de diciembre de 2019.

Los síntomas de la enfermedad incluyen fiebre, tos seca, dolor muscular y problemas respiratorios tal como dificultad para respirar/falta de aire. En casos más graves, la infección puede provocar neumonía, síndrome respiratorio agudo severo, insuficiencia renal e incluso la muerte. Las tasas de mortalidad han sido estimadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en hasta el 3.4% de los individuos infectados, con muchos comentaristas coincidiendo en una tasa de mortalidad de aproximadamente el 1-2% de los individuos infectados una vez que se ajustan las cifras, teniendo en cuenta los casos más leves que no siempre se notifican (por ejemplo, si los individuos no buscaron tratamiento o diagnóstico).

Según el informe de la Organización Mundial de la Salud del 7 de marzo de 2020, el número mundial de casos confirmados de COVID-19 había superado los 100,000.

Actualmente no están disponibles vacunas o tratamientos autorizados para las infecciones por SARS-CoV2. Hasta ahora, las estrategias de control de enfermedades en curso se han basado en minimizar el contacto con los individuos

infectados, observando las medidas estándar de control de infecciones para limitar la transmisión nosocomial, el rastreo de contactos y la cuarentena. Numerosos países han implementado medidas de cuarentena que afectan a millones de personas incluso en el origen del brote en China. Países europeos como Italia han puesto en cuarentena hasta a 16 millones de personas, más de una cuarta parte de la población.

Los impactos sanitarios y económicos de las numerosas epidemias han sido graves y continúan aumentando. El informe de la Organización Mundial de la Salud del 11 de marzo de 2020 caracterizó el brote como una pandemia. Esta es la primera pandemia causada por un coronavirus. La ausencia de cualquier tratamiento específico está agravando el impacto económico y, lo que es más importante, es un problema que conduce a la pérdida de vidas humanas. La falta de cualquier vacuna contra este virus es un problema grave en la técnica.

Los efectos logísticos de los cambios a gran escala en el comportamiento como respuesta al brote de SARS-CoV2 son significativos y están causando riesgos secundarios para la salud. Por ejemplo, el 9 de marzo de 2020, el Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (DEFRA) del gobierno del Reino Unido se vio obligado a relajar su aplicación de las restricciones a los vehículos de reparto para permitir entregas adicionales de artículos de escasez, incluyendo medicamentos sin receta, tales como antiinflamatorios, productos de higiene tales como papel higiénico y alimentos básicos. Estos son problemas adicionales resultantes de la falta de control de la infección/transmisión del SARS-CoV2.

El documento WO2018/215766 describe una vacuna para el coronavirus MERS (síndrome respiratorio de Oriente Medio) (MERS-CoV). Un vector mencionado en este documento es ChAdOx1. La vacuna comprende la proteína de pico del MERS CoV de longitud completa con un tPA líder humano añadido en el extremo 5'. En una realización, la parte relevante de la secuencia de nucleótidos es codón optimizado para uso humano. Sin embargo, cuando los inventores procedieron a fabricar para preparar la producción de GMP (Buenas Prácticas de Fabricación), descubrieron que solo podían hacerlo usando una línea celular reprimida por tet, lo cual es un problema. Los inventores tuvieron numerosas dificultades en la fabricación de esta vacuna a la escala deseada.

El presente documento busca superar los problemas asociados a la técnica anterior.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se ha descrito una combinación que comprende un vector adenoviral de simio (tal como ChAdOx1) que libera un antígeno de SARS-CoV2 (la proteína de pico). Esta combinación se ha producido con especial atención a las secuencias de nucleótidos que codifican para el antígeno y, en particular, abordando problemas técnicos de estabilidad genética y reordenamientos/mutaciones de secuencias. Este enfoque ha brindado beneficios técnicos sorprendentes, incluyendo una producción eficiente de alto rendimiento sin la necesidad de represión de Tet, así como un virus intacto que se rescató con éxito con las secuencias de carga correctas conservadas. Un beneficio clave que ofrece esta nueva combinación es la inducción de fuertes respuestas inmunes después de una administración de vacuna individual.

Además, los inventores describen la incorporación opcional de una secuencia líder/secuencia secretora tal como la secuencia de aminoácidos del activador tisular del plasminógeno (tPA) fusionada con el extremo N-terminal del antígeno de la proteína de pico del SARS-CoV2. Esta triple combinación (ChAdOx1 + tPA + proteína de pico del SARS-CoV2) ofrece una inmunogenicidad mejorada. Los inventores proporcionan datos que demuestran que una sola dosis de este constructo combinada proporciona aumentos significativos en las respuestas inmunes relevantes; los datos que demuestran estas ventajas se proporcionan en la sección de Ejemplos a continuación.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un vector viral, comprendiendo el vector viral ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína de pico del coronavirus SARS-CoV2, caracterizada porque dicho vector viral es un vector basado en adenovirus.

De manera adecuada, dicho vector basado en adenovirus es un vector basado en adenovirus de simio.

De manera adecuada, dicho vector basado en adenovirus es ChAdOx 1.

De manera adecuada, dicha proteína de pico comprende los dominios de unión al receptor (RBD).

De manera adecuada, dicha proteína de pico es una proteína de pico de longitud completa.

De manera adecuada, dicha proteína de pico está presente como una fusión con la secuencia del activador tisular del plasminógeno (tPA) en el orden N-terminal - tPA - proteína de pico - C-terminal.

De manera adecuada, dicho tPA tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

De manera adecuada, dicha proteína de pico tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, dicha secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, preferiblemente SEQ ID NO: 4.

De manera adecuada, dicha secuencia de vector viral es como en el número de registro de ECACC 12052403.

De manera adecuada, la administración de una dosis única de una composición tal como se describió anteriormente a un sujeto mamífero induce inmunidad protectora en dicho sujeto.

De manera adecuada, la administración de dos dosis de una composición tal como se describió anteriormente a un sujeto mamífero induce inmunidad protectora en dicho sujeto.

De manera adecuada, la administración de una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a un sujeto mamífero, seguido por la posterior administración de una segunda dosis de dicha composición a dicho sujeto, induce inmunidad protectora en dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2.

De manera adecuada dicha respuesta inmune es una respuesta inmune en un sujeto mamífero.

En otra realización, la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una

respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que a dosis única de dicha composición se administra a dicho sujeto.

En otra realización, la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que dos dosis de dicha composición se administran a dicho sujeto.

En otra realización, la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que una primera dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto, y posteriormente una segunda dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que se administra dicha composición una vez.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que se administra dicha composición dos veces.

En otra realización, la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para la inducción de, o para su uso en la inducción de, una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que una primera dosis de dicha composición se

administra a dicho sujeto, y posteriormente una segunda dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto. De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 12 meses.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 60 meses.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2.

De manera adecuada, prevenir la infección por SARS-CoV2 es prevenir la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que se administra una dosis única de dicha composición.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que dos dosis de dicha composición se administran a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que una primera dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto, y posteriormente una segunda dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para

prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que se administra dicha composición una vez.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que se administra dicha composición dos veces.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para prevenir, o para su uso en la prevención de la infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, en la que una primera dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto, y posteriormente una segunda dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 12 meses.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 60 meses.

En otra realización la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la medicina.

En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para su uso en la medicina. En otra realización la invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente para su uso como un medicamento.

En otra realización la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la preparación de un medicamento para la prevención de, o para su uso en la prevención de, infección por SARS-CoV2.

De manera adecuada, la prevención de infección por SARS-CoV2 es la prevención de infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero.

En otra realización la invención se refiere a un método de inducción de una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a un método de inducción de una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar una dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que una dosis única de dicha composición se administra a dicho sujeto.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez.

En otra realización la invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que dos dosis de dicha composición se administran a dicho sujeto.

En otra realización la invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente en el que una primera dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto, y posteriormente una segunda dosis de dicha composición se administra a dicho sujeto.

De manera adecuada, se administra dicha composición dos veces.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 12 meses.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez cada 60 meses.

De manera adecuada, se administra dicha composición por una vía de administración seleccionada de un grupo que consiste en intranasal, aerosol, intradérmica e intramuscular.

De manera adecuada, dicha administración es intranasal o intramuscular.

De manera adecuada, dicha administración es intramuscular.

De manera adecuada, dicha proteína de pico es una proteína de pico de longitud completa.

Un ejemplo de una secuencia de proteína de pico del CoV útil en la invención es la proteína de pico de vCoV-19 del aislado de coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo Wuhan-Hu-1, es decir, la proteína de pico codificada por el genoma viral con el número de registro de GenBank MN908947.

De manera más adecuada, dicha proteína de pico tiene la secuencia de aminoácidos como en (o codificada en) el genoma de SARS-CoV2 del número de registro de GenBank MG772933.1 (Bat-SL-CoVZC45 aislado de coronavirus de tipo SARS de murciélago).

De manera más adecuada, el SARS-CoV2 puede ser bat-SL-CoVZC45 aislado.

De manera más adecuada, dicha proteína de pico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de la proteína de Pico del SARS-CoV2 solamente (sin fusión de tPA)

FVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLI
VNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD
LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITR

FQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPL
SETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIY
QAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTN
LVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCS
FGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL
IGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSN
NSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALT
GIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT
LADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGW
TFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASAL
GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSL
QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFL
HVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFV
SGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQK
EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSC
CSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

SEQ ID NO: 11: Secuencia de nucleótidos para la proteína de pico del genoma de nCoV 19

(Del Número de Registro de GenBank MG772933.1)

ATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAAC
CAGAACTCAATTACCCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTTTATTACCCTG
ACAAAGTTTTCAGATCCTCAGTTTTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCTTTCTTT
TCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATACATGTCTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGTT
TGATAACCCTGTCCTACCATTTAATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCACTGAGAAGTCTA
ACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCGAAGACCCAGTCCCTACTT
ATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGTCTGTGAATTTCAATTTTGTAATGA
TCCATTTTTGGGTGTTTATTACCACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCA
GAGTTTATTCTAGTGCGAATAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTTCTTATG
GACCTTGAAGGAAAACAGGGTAATTTCAAAAATCTTAGGGAATTTGTGTTTAAGAATAT

TGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAGTGCGTGATCTCC

CTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTTGCCAATAGGTATTAACATCACT

AGGTTTCAAACTTTACTTGCTTTACATAGAAGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTC

AGGTTGGACAGCTGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTC

TATTAAAATATAATGAAAATGGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCT

CTCTCAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAAC

TTCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCCTAATATTACAAACT

TGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAAC

AGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATT

TTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACTA

ATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGG

CAAACTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGT

TATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGT

ATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATC

TATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTTGAAGGTTTTAATTGTTACTTTCCTTT

ACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAG

TACTTTCTTTTGAACTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACT

AATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTTAACAGGCACAGGTGT

TCTTACTGAGTCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTG

ACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATTCTTGACATTACACCATGT

TCTTTTGGTGGTGTCAGTGTTATAACACCAGGAACAAATACTTCTAACCAGGTTGCTGT

TCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTA

CTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGT

TTAATAGGGGCTGAACATGTCAACAACTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGG

TATATGCGCTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTA

GTCAATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCT

AATAACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTTACCACAGAAATTCTACC

AGTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAACTG

AATGCAGCAATCTTTTGTTGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAAACCGTGCTTTA

ACTGGAATAGCTGTTGAACAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTTGCACAAGTCAAACA

AATTTACAAAACACCACCAATTAAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTAC

CAGATCCATCAAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTG
ACACTTGCAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGGTGATATTGCTGC
TAGAGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTTAACGGCCTTACTGTTTTGCCACCTTTGCTCA
CAGATGAAATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTGGT
TGGACCTTTGGTGCAGGTGCTGCATTACAAATACCATTTGCTATGCAAATGGCTTATAG
GTTTAATGGTATTGGAGTTACACAGAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAATTGATTGCCA
ACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAAATTCAAGACTCACTTTCTTCCACAGCAAGTGCA
CTTGGAAAACTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAA
ACAACTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTC
TTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGT
TTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAA
TCTTGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTT
GTGGAAAGGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCTCAGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTC
TTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGAACTTCACAACTGCTCCTGCCATTTG
TCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCACACACT
GGTTTGTAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATTACTACAGACAACACATTT
GTGTCTGGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTTATGATCCTTT
GCAACCTGAATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTAAGAATCATACAT
CACCAGATGTTGATTTAGGTGACATCTCTGGCATTAATGCTTCAGTTGTAAACATTCAA
AAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCT
CCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTT
TTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGT
TGCTGTAGTTGTCTCAAGGGCTGTTGTTCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGA
CGACTCTGAGCCAGTGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAA

De manera adecuada, el ácido nucleico que codifica para el antígeno de la proteína de pico y/o que codifica para la fusión del antígeno de la proteína de pico de tPA es un codón optimizado para seres humanos.

De manera adecuada, el ácido nucleico que codifica para el antígeno de la proteína de pico y/o que codifica para la fusión del antígeno de la proteína de pico de tPA, se

sustituye para eliminar series de nucleótidos repetidos tales como 5 o más apariciones consecutivas del mismo nucleótido.

De manera adecuada, el ácido nucleico que codifica para el antígeno de la proteína de pico y/o que codifica para la fusión del antígeno de la proteína de pico de tPA, es un codón optimizado para seres humanos y se sustituye para eliminar series de nucleótidos repetidos tales como 5 o más apariciones consecutivas del mismo nucleótido.

De manera adecuada, dicha secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3

Esto presenta una secuencia de nucleótidos tal como se revisa por el inventor (es decir, después de la optimización de codones para seres humanos se introdujeron series de las mismas bases y después de que esas series de las mismas bases se revisaran para retener la misma secuencia de codificación pero eliminar las repeticiones) sin tPA codificado.

SEQ ID NO: 3 – Sin tPA líder

TTCGTGTTCCTGGTGCTGCTGCCACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAG
GACACAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACCCAGACA
AGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGC
AACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGA
CAACCCAGTGCTGCCCTTCAACGACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACA
TCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATC
GTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCC
ATTCCTGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGG
TGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGAC
CTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGA
CGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACACCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTC
AGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCACTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGG

TTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCTCTGG
ATGGACAGCTGGCGCCGCTGCCTACTATGTGGGATACCTGCAGCCTCGGACCTTCCTGC
TGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTG
AGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAG
CAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGT
GCCCATTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGG
AAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAG
CACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACG
TGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAG
ACAGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGAT
TGCCTGGAACAGCAACAACCTGGATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACC
GGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTAT
CAGGCCGGCAGCACACCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCA
GTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGC
TGAGCTTCGAGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAAT
CTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCT
GACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGATATCGCCGATA
CCACAGATGCCGTCAGAGATCCTCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACACCTTGCAGC
TTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACGCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCT
GTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACAC
CTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTG
ATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCTATCGGCGCTGGCAT
CTGCGCCTCTTACCAGACACAGACAAACAGCCCTAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCC
AGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAAC
AACTCTATCGCTATCCCGACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGT
GTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGT
GCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACA
GGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGAT
CTACAAGACGCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCG
ATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACA
CTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAG

GGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCG
ATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGG
ACATTTGGAGCTGGCGCTGCCCTGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTT
CAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACC
AGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTG
GGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCA
GCTGTCTAGCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGG
ACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTG
CAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCT
GGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCG
GCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCGCCTCACGGCGTGGTGTTTCTG
CACGTGACATACGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCA
CGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGT
TCGTGACCCAGCGGAACTTCTACGAGCCTCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTG
TCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCA
GCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGATAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCC
CTGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAA
GAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCA
AGAACTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTA
TCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGC
TGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGA
TTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACCTGA

De manera más adecuada, dicha secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 Esto presenta la secuencia de nucleótidos preferida tal como se revisa por el inventor (es decir, después de la optimización de codones para seres humanos se introdujeron series de las mismas bases y después de que esas series de las mismas bases se revisaran para retener la misma secuencia de codificación pero eliminar las repeticiones) con tPA

codificado. Ésta es una realización altamente preferida de la invención.

SEQ ID NO: 4 – Con la sección que codifica para el tPA líder subrayado

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGTTTGT
GTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTCCTGGTGCTGCTGC
CACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAGGACACAGCTGCCTCCAGCCTAC
ACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACCCAGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCT
GCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCA
TCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCAGTGCTGCCCTTCAAC
GACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGG
CACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGG
TCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCATTCCTGGGCGTCTACTACCAC
AAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTG
CACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACT
TCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGC
AAGCACACACCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACC
ACTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGC
ACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCCGCTGCC
TACTATGTGGGATACCTGCAGCCTCGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCAC
CATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGA
AGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACC
GAATCCATCGTGCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAA
TGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGG
CCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTG
TCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGAT
CCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACA
ACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTG
GATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCT
GAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACACCTTGTA
ACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACA

AATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCATGC
TCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGA
ACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTC
CTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGATGCCGTCAGAGATCC
TCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACACCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCA
CGCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACC
GAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCAC
CGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACA
ATAGCTACGAGTGCGACATCCCTATCGGCGCTGGCATCTGCGCCTCTTACCAGACACAG
ACAAACAGCCCTAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAAT
GTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCGACCA
ACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTG
GACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTA
CGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACA
AGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACGCCTCCTATCAAG
GACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCG
GAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCA
AGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAG
TTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACAC
ATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCTGCCC
TGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAG
AATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAA
GATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCA
ACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCTAGCAACTTCGGCGCC
ATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCA
GATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGC
TGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAG
TGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAG
CTTCCCTCAGTCTGCGCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATACGTGCCCGCTC
AAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCT
AGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACCCAGCGGAACTTCTA

CGAGCCTCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGA
TCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAA
GAGGAACTGGATAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCTGACGTGGACCTGGGCGATAT
CAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGG
TGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGCAAGTACGAGCAG
TACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTT
GTAGCTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGC
GTGAAACTGCACTACACCTGA

De manera adecuada, dicha proteína de pico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 - Secuencia de aminoácidos de la fusión tPA-Pico (tPA subrayado)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAY
TNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFN
DGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYS
KHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA
YYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPT
ESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGV
SPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNL
DSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPT
NGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKF
LPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQ
TNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSV
DCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIK
DFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQK
FNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ
NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE
CVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFP

REGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFK
EELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ
YIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKG
VKLHYT

De manera adecuada, el régimen de vacunación primaria es de una dosis. En algunas realizaciones puede ser deseable volver a administrar en una fecha posterior. Los intervalos entre la primera y la segunda dosis se dan a conocer en los ejemplos. En algunas realizaciones, puede ser deseable volver a administrar en una fecha posterior, no menos de 6 meses después de la primera inmunización. De manera adecuada, puede ser deseable volver a administrar en una fecha posterior, como aproximadamente 12 meses después de la primera inmunización. De manera adecuada, puede ser deseable volver a administrar en una fecha posterior, tal como aproximadamente 12 a 60 meses tras la primera inmunización. En una realización, de manera adecuada, se proporciona una segunda administración o adicional aproximadamente 12 meses después de la primera inmunización. En una realización, de manera adecuada, se proporciona una segunda administración o adicional aproximadamente 60 meses después de la primera inmunización.

En una realización, de manera adecuada, se proporciona una segunda administración o adicional más de 60 meses después de la primera inmunización.

En una realización, de manera adecuada, una segunda administración incluso más tardía o adicional es incluso mejor.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la medicina.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la preparación de un medicamento para la prevención de infección por SARS-CoV2.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la inducción de una respuesta inmune frente a SARS-CoV2. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la inmunización de un sujeto frente a SARS-CoV2. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición tal como se describió anteriormente en la prevención de infección por SARS-CoV2.

Un método de inducción de una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto.

De manera adecuada, una dosis única de dicha composición se administra a dicho sujeto.

De manera adecuada, se administra dicha composición una vez.

De manera adecuada, dicha composición puede administrarse una vez cada 6 meses.

De manera más adecuada, se administra dicha composición una vez cada 12 meses.

De manera más adecuada, se administra dicha composición una vez cada 60 meses.

De manera adecuada, se administra dicha composición por una vía de administración seleccionada de un grupo que consiste en subcutánea, intranasal, aerosol, nebulizador, intradérmica e intramuscular.

De la manera más adecuada, dicha administración es intramuscular o intranasal.

De la manera más adecuada, dicha administración es intramuscular.

En un aspecto, la invención se refiere a un vector viral basado en adeno que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína de pico de SARS-CoV2. De manera adecuada, el vector viral basado en adeno es ChAdOx 1.

En un aspecto, la invención se refiere a un vector ChAdOx que comprende un polinucleótido que codifica para la glicoproteína S a partir del virus SARS-CoV2. De manera adecuada, dicho vector viral basado en adeno tiene la secuencia y/o construcción tal como se describe en uno o más de los ejemplos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar una respuesta inmune mediante la administración del vector viral basado en adeno tal como se describió anteriormente.

En un aspecto, la invención se refiere al vector viral basado en adeno tal como se describió anteriormente para su uso en la prevención de infección por SARS-CoV2.

En un aspecto, la invención se refiere al vector viral basado en adeno tal como se describió anteriormente para su uso en aumentar una respuesta inmune anti-SARS-CoV2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El coronavirus 19 (SARS-CoV2; nCoV-19; a veces denominado COVID-19) significa el virus responsable de un brote de enfermedad por coronavirus en seres humanos que se informó por primera vez desde Wuhan, China, el 31 de diciembre de 2019. Ahora el virus se conoce de manera apropiada como SARS-CoV2. La enfermedad que causa es COVID-19. Más específicamente, SARS-CoV2 significa el virus que tiene un genoma que comprende la secuencia de nucleótidos de número de registro MN908947 o MG772933.1, de manera más adecuada, MG772933.1.

De manera adecuada, los anticuerpos inducidos tal como se describe en el presente documento son anticuerpos neutralizantes, es decir, anticuerpos que pueden neutralizar partículas virales del SARS-CoV2.

Los inventores han preparado una vacuna frente a SARS-CoV2. Los datos preclínicos muestran excelentes resultados; se hace referencia a la sección de ejemplos a continuación. Tan pronto como se publicó la secuencia de SARS-CoV2, se inició la producción de una vacuna de grado de investigación adecuada para estudios preclínicos y una disolución madre de semillas de vacuna pre-GMP. El diseño de la vacuna comprende la proteína de pico de SARS-CoV2 completa expresada bajo el control de un promotor de mamífero fuerte, que incluye secuencias represoras de Tet para permitir la represión de la expresión del antígeno durante la fabricación de la vacuna, mejorando los rendimientos de la vacuna. La preparación de la vacuna para los estudios preclínicos fue bien y los experimentos de inmunización en ratones se llevaron a cabo de inmediato (véase la sección de ejemplos).

Los inventores enseñan la rápida fabricación y desarrollo clínico de ChAdOx1 SARS-CoV2.

De manera adecuada, la composición de la invención comprende ChAdOx1 :: La proteína de pico de SARS-CoV2, es decir, ChAdOx1 que comprende un inserto de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de pico de SARS-CoV2.

De manera adecuada, se usa la proteína de pico de longitud completa.

De manera adecuada, se añade una secuencia de tPA líder humana en el extremo 5’.

De manera adecuada, la secuencia de nucleótidos tiene codones optimizados para el uso de codones humanos.

Además, el inventor estudió adicionalmente la secuencia y trazó la idea de eliminar series de bases repetidas de la secuencia. En más detalle, el primer codón del inventor optimizó la secuencia codificante del antígeno para el uso del codón humano. De manera más adecuada, el inventor optimizó con codones la secuencia de nucleótidos que codifica para la fusión del antígeno de la proteína de pico de tPA-SARS-CoV2 para el uso del codón humano. Sin embargo, tal como se explicó anteriormente, basándose en conocimientos intelectuales al revisar la secuencia, el inventor notó que había varios parches en los que el procedimiento de optimización del codón humano había dado como resultado corridas de nucleótidos idénticos. Por ejemplo, se observaron series de 5 bases "C" consecutivas (bases de citosina). El inventor trazó la idea de que estas secuencias repetitivas podrían estar causando problemas en la expresión, dando lugar a problemas de rendimiento de la vacuna y/o acontecimientos de "deslizamiento" de la

polimerasa, lo que conduce a problemas en la producción de la vacuna del vector viral debido a la inestabilidad del ácido nucleico (por ejemplo, mutaciones, reordenamientos tales como truncamientos, etc). Con el fin de abordar estos problemas técnicos, al inventor se le ocurrió la idea de mutar adicionalmente la secuencia optimizada de codones ya mutada. Por tanto, el inventor procedió a diseñar y preparar sustituciones adicionales en la secuencia de nucleótidos, conservando cuidadosamente los aminoácidos codificados usando el código genético universal, mientras cambiaba las bases de nucleótidos y seleccionando codones alternos para eliminar las secuencias repetidas propensas al deslizamiento mientras aseguraba que la secuencia codificante todavía codificaba con precisión el antígeno deseado. Tal como puede observarse en los datos presentados en la sección de ejemplos, su enfoque fue muy exitoso y entregó el beneficio técnico de facilitar la producción de vacunas de vectores virales, obteniendo buenos rendimientos de virus. El virus obtenido de esta manera también demostró una excelente inmunogenicidad y otras propiedades discutidas en el presente documento.

Los inventores se sorprendieron de que:

- Los rendimientos de vacunas de la composición del vector viral SARS-CoV2 parecen ser iguales con o sin represión de tet. Los inventores encontraron esto extraordinario. En vista de los problemas e inconvenientes encontrados al preparar la fabricación de GMP de la vacuna MERS-CoV descrita en el documento WO2018/215766 (discutido anteriormente en la sección de Antecedentes), la opinión antes de esta invención era que para todas las glicoproteínas virales sería necesaria la represión de tet.

La opinión fue que estas glicoproteínas virales son tóxicas, de ahí el requisito de la represión de Tet durante la fabricación. La invención demuestra el sorprendente beneficio de que la represión de Tet NO es necesaria para la fabricación de la composición del vector viral SARS-CoV2.

- Ha sido notablemente rápido y fácil rescatar virus del plásmido. Se han realizado las preparaciones de virus en un tiempo récord. Algunas de estas preparaciones incluso se han realizado en un tiempo récord a pesar de incluir en el procedimiento las ya innecesarias etapas de represión del tet. Por lo tanto, la velocidad y facilidad para rescatar virus del plásmido es un beneficio técnico adicional proporcionado por la invención.

- La inmunogenicidad en ratones a los 10 días es realmente fuerte. Se ha hecho referencia a la sección de ejemplos a continuación.

En más detalle, debe observarse que los inventores habían estado investigando una versión revisada del vector viral que codifica para la proteína de pico MERS (es decir, tal como se describe en el documento WO2018/215766) con series de bases repetidas eliminadas. Después de una gran cantidad de trabajo por estos investigadores experimentados que están a la vanguardia de este campo de investigación, todavía no había sido posible preparar una disolución madre de semillas de vector viral que codificara la proteína de pico MERS que fuera genéticamente correcta. En el mejor de los casos, cuando los inventores encontraron que el antígeno de pico de MERS era correcto, hubo una o más deleciones espontáneas en la región promotora. En primer lugar, estas observaciones muestran que la eliminación de

series de bases repetidas no explica completamente el efecto/los inconvenientes de la composición de MERS de la técnica anterior. En segundo lugar, estas observaciones muestran que la eliminación de ejecuciones de bases repetidas no es un enfoque simple o directo que se pueda aplicar simplemente con una expectativa de éxito, ya que si este fuera el caso, la expectativa habría sido que la composición de MERS con ejecuciones de bases repetidas eliminadas habrían funcionado, pero no fue así. Esta es una prueba adicional de la imprevisibilidad en la técnica y una prueba de los efectos sorprendentes de la presente invención.

En más detalle, un problema adicional experimentado por los inventores en diferentes áreas de su investigación les había llevado a la conclusión de que las glicoproteínas virales eran consistentemente tóxicas en los sistemas de producción de partículas virales usados para la fabricación. Por tanto, los inventores habían concluido que la represión de Tet siempre sería necesaria para evitar problemas de toxicidad. Se reforzó esta hipótesis por sus observaciones trabajando con antígenos proteicos virales internos, que no parecían experimentar los mismos problemas de toxicidad que las glicoproteínas virales. La presente invención que emplea la proteína de pico de SARS-CoV2 es una clara excepción a esta regla y es una prueba adicional de la actividad de la invención.

En más detalle, incluso la elección de la secuencia viral a usar para derivar las secuencias antigénicas de la invención fue una elección intelectual que tuvo que hacerse. Por ejemplo, la primera secuencia para el SARS-CoV-2 se publicó el viernes 10 de enero de 2020. Se lanzaron secuencias virales adicionales durante los días siguientes, por ejemplo:

Secuencias virales que fueron lanzadas:

Nombre del virus	ID de Registro	Detalles/historia del pasaje	Fecha de colección	Huésped	Laboratorio de origen	Laboratorio de envío
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019	EPI_ISL_402119	Aislamiento de virus, pasaje 1	2019-12-30	Ser humano	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de Enfermedades Virales, China CDC	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de Enfermedades Virales, China CDC

Nombre del virus	ID de Registro	Detalles/historia del pasaje	Fecha de colección	Huésped	Laboratorio de origen	Laboratorio de envío
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-04/2020	EPI_ISL_402120	Original	2020-01-01	Ser humano	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de Enfermedades Virales, China CDC	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de Enfermedades Virales, China CDC
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-05/2019	EPI_ISL_402121	Original	2019-12-30	Ser humano	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de	Instituto Nacional para el Control y la Prevención de

Nombre del virus	ID de Registro	Detalles/historia del pasaje	Fecha de colección	Huésped	Laboratorio de origen	Laboratorio de envío
					Enfermedades Virales, China CDC	Enfermedades Virales, China CDC
BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019	EPI_ISL_402123	Original	2019-12-24	Ser humano	Instituto de Biología de Patógenos, Academia China de Ciencias Médicas y Facultad de Medicina de la Unión de Pekín	Instituto de Biología de Patógenos, Academia China de Ciencias Médicas y Facultad de Medicina de la Unión de Pekín

Nombre del virus	ID de Registro	Detalles/historia del pasaje	Fecha de colección	Huésped	Laboratorio de origen	Laboratorio de envío
BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019	**EPI_ISL_402124**	**Original**	**2019-12-30**	**Ser humano**	**Hospital Wuhan Jinyintan**	**Instituto de Virología de Wuhan, Academia de Ciencias de China**

No estaba claro cuál de las secuencias sería mejor incluir en las composiciones/vacuna, por ejemplo, debido a la sospecha de polimorfismos.

Se llevó a cabo un análisis incluyendo varias alineaciones de secuencia y basándose en este análisis se seleccionó la secuencia viral que va a incluirse en las composiciones de la invención.

Se proporcionan los datos de inmunogenicidad del ratón para demostrar las propiedades beneficiosas de la invención (véase la sección de ejemplos).
Es una ventaja adicional de la invención que se obtuvieron respuestas de anticuerpos y células T realmente fuertes en ratones después de solo 10 días.
Se cree que la combinación de ChAdOx1 con el antígeno de SARS-CoV2 usado en este trabajo no se ha dado a conocer previamente y, por tanto, es novedosa.
La sensibilización-refuerzo de la técnica anterior usando candidatos a vacunas basados en MVA produce una respuesta inmune muy robusta, como se ha demostrado repetidamente con un gran número de antígenos diferentes en diversas indicaciones. Es una ventaja de la invención que una administración de ChAdOx-SARS-CoV2 crea una fuerte respuesta inmune. Esta respuesta de una dosis única de ChAdOx-SARS-CoV2 fue inesperadamente fuerte y tiene varios beneficios que incluyen un tratamiento más rápido y simple y una fabricación y un tratamiento más baratos.
Se ha dado a conocer que las composiciones de vacuna basadas en ChAdOx1 descritas en el presente documento frente al SARS-CoV2 provocan anticuerpos y respuestas inmunes celulares en ratones.
Se han descrito cuatro vacunas frente al SARS-CoV2 basadas en vectores virales ChAdOx1 y MVA, dos vacunas por vector. Todas las vacunas contienen el gen de pico de longitud completa del SARS-CoV2; se produjeron las vacunas ChAdOx1 SARS-CoV2 con o sin la secuencia líder del gen activador tisular del plasminógeno humano (tPA) donde se produjeron las vacunas MVA SARS-CoV2 con tPA, y el promotor mH5 o F11 que conduce a la expresión del gen de pico.

Se ha dado a conocer el desarrollo de candidatos a vacunas que se basan en dos vectores virales diferentes: Adenovirus de chimpancé, Universidad de Oxford n.º 1 (ChAdOx1) (26) y virus vaccinia Ankara modificado (MVA) (27, 28). Cada vector viral se desarrolló generando dos versiones alternativas, dando como resultado cuatro candidatos a vacunas que todos codifican para el mismo gen de pico de SARS-CoV2 completo (S). Las dos vacunas basadas en ChAdOx1 se produjeron con o sin el péptido señal del gen activador tisular del plasminógeno humano (tPA) en el extremo N terminal. Estudios anteriores han mostrado que la codificación de tPA hacia 5` de antígenos recombinantes mejora la inmunogenicidad, aunque los resultados difieren dependiendo de los antígenos empleados. El tPA codificado hacia 5` de la nucleoproteína del virus de la influenza A, en un vector de ADN, mejoró las respuestas inmunes tanto celulares como humorales en ratones (29, 30), mientras que la misma secuencia líder dio como resultado un aumento de las secuencias humorales pero disminuyó las respuestas celulares frente al VIH Gag (30). Las dos vacunas basadas en MVA se produjeron con el promotor poxviral mH5 o F11 que conduce a la expresión del antígeno, y ambos incluyen la secuencia de tPA en el extremo N terminal de la proteína de pico del SARS-CoV2. Anteriormente, se ha informado de la capacidad del promotor F11 temprano fuerte para mejorar la inmunogenicidad celular de los candidatos a antígenos vacunales para la malaria y la influenza, en comparación con la utilización de promotores tempranos/tardíos p7.5 o mH5, que dio como resultado un nivel más bajo de expresión génica inmediatamente después del la infección por virus de las células diana, pero niveles más altos en una etapa

posterior (31). Aquí, se siguió evaluando el promotor F11 en la mejora de la inmunogenicidad celular, y para investigar su capacidad para impactar en las respuestas inmunes humorales.

Los inventores identificaron el principal antígeno de superficie del SARS-CoV2 como Pico (proteína S) y demostraron que ChAdOx1 que expresa esta proteína induce la producción de anticuerpos anti-S, después de una única inmunización intramuscular.

SENSIBILIZACIÓN-REFUERZO

La invención también encuentra aplicación en regímenes de inmunización de sensibilización-refuerzo. Por ejemplo, si después de un período de tiempo la respuesta inmune disminuye, como tiende a ocurrir naturalmente con muchas respuestas inmunes, entonces puede ser deseable reforzar la respuesta en un paciente a niveles útiles como niveles protectores.

La dosis de refuerzo puede ser una dosis de refuerzo homóloga, es decir, puede lograrse una segunda administración de la misma composición que se usó para la inmunización de sensibilización original. En otra realización, la inmunización de dosis de refuerzo puede llevarse a cabo usando una composición diferente a la composición usada para la inmunización de sensibilización original. Esto se hace referencia como sensibilización-refuerzo heterólogo. De manera adecuada, el refuerzo heterólogo (es decir, el segundo para la inmunización adicional) comprende una o más composiciones seleccionadas de MVA, ARN, ADN, proteína, vector viral basado en adenovirus, vector viral basado en adenovirus de simio, vector viral basado en adenovirus basado en gorila o vector

viral basado en adenovirus humano. De manera más adecuada, la inmunización de refuerzo (segunda o adicional) puede comprender MVA, ARN o proteína. De manera más adecuada, el refuerzo (segunda o adicional inmunización) puede comprender ARN o proteína.

Las ventajas de regímenes de dosis de refuerzo (es decir, que implican una administración/inmunización segunda o adicional) incluyen aumentar el nivel de respuesta inmune en el sujeto, y/o aumentar la duración de la respuesta inmune.

Si se requiere un régimen de dos dosis, por ejemplo, para aplicaciones particulares tales como inmunidad sostenida (por ejemplo, en trabajadores sanitarios), se prefieren ChAdOx1/MVA o ChAdOx1/ARN o ChAdOx1/proteína como regímenes de sensibilización/refuerzo.

De manera más adecuada, si se requiere un régimen de dos dosis, se prefiere un régimen de sensibilización-refuerzo homólogo como ChAdOx1/ChAdOx1, de manera más adecuada, ChAdOx1 nCoV-19/ChAdOx1 nCoV-19.

Régimen de vacunación típico de ARN modificado o ARNm autoamplificado

Se administran dos dosis de vacuna, normalmente entre 4 y 8 semanas entre cada dosis

Régimen de vacunación con proteínas típico

Dos o tres dosis de vacuna administradas, normalmente 4-8 semanas entre cada dosis y el adyuvante también debe administrarse en la inmunización.

Régimen de vacunación con vector viral ventajoso según la invención:

Una dosis de vacuna administrada

En realizaciones de refuerzo, de manera adecuada, la primera administración comprende, o consiste en, una composición según la presente invención que comprende un vector viral que puede expresar la proteína de pico del SARS-CoV2.
De manera adecuada, la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende exactamente el mismo antígeno como para el vector viral.
De manera adecuada, la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende una vacuna de ARN.
De manera adecuada, la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende una vacuna de ARN autoamplificadora.
De manera adecuada, la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende la administración IM.
De manera adecuada, cuando la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende adyuvante, dicho adyuvante se selecciona por el operador dependiendo de la plataforma. Cuando la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende ARNa, no se necesita adyuvante.
De manera adecuada, cuando la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende ARN, la dosis está de manera adecuada en el rango de 0.001 a 1 microgramos.
De manera adecuada, cuando la segunda o adicional administración ('dosis de refuerzo') comprende proteína, la dosis está de manera adecuada en el rango de 1 a 15 microgramos.
DOSIS DE SENSIBILIZACIÓN-REFUERZO

Se dividieron los participantes incluidos en el análisis en grupos que recibieron dos niveles de dosis diferentes como primera dosis (es decir, como primera administración (sensibilización)).
Las dosis de la primera administración (sensibilización) fueron

- 2.5×10^{10} vp (grupo de 'dosis baja'/'media dosis') y
- 5.0×10^{10} vp (grupo de 'dosis estándar'/'dosis completa').

Por tanto, en una realización la invención se refiere a un régimen de administración doble en el que se administran una primera administración y una segunda administración a un solo sujeto, en el que la razón de la dosis de la primera administración con respecto a la dosis de la segunda administración es de 0.5:1.
Por tanto, en otra realización la invención se refiere a un régimen de administración doble en el que se administran una primera administración y una segunda administración a un solo sujeto, en el que la razón de la dosis de la primera administración con respecto a la dosis de la segunda administración es de 1:1.
El análisis combinado incluyendo todos los participantes (n = 11,636) dio como resultado una eficacia promedio del 70%. Los participantes que recibieron media dosis como primera dosis ('dosis baja'), seguida de una dosis completa ('dosis estándar') al menos un mes después (n = 2,741) (es decir, una razón de la dosis de la primera administración con respecto a la dosis de la segunda administración de 0.5:1) mostró una eficacia de la vacuna del 90%.
En los participantes que habían recibido dos dosis estándar (dosis completas), al menos un mes de diferencia (n =

8,895) (es decir, una razón de la dosis de la primera administración con respecto la dosis de la segunda administración de 1:1), la eficacia de la vacuna fue del 62%.

La vacuna puede almacenarse, transportarse y manipularse en condiciones normales de refrigeración (2-8 grados Celsius/36-46 grados Fahrenheit) durante al menos seis meses y administrarse dentro de los entornos de atención médica existentes.

La invención también proporciona una composición tal como se describió anteriormente, en la que la administración de una primera dosis de dicha composición a un sujeto mamífero seguido por la administración de una segunda dosis de dicha composición a dicho sujeto mamífero induce inmunidad protectora en dicho sujeto.

La invención también proporciona un método de inducir una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método

(i) administrar una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto; y

(ii) administrar una segunda dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto,

en el que dicha segunda dosis comprende aproximadamente dos veces el número de partículas virales de dicha primera dosis.

La invención también proporciona un método de prevención de infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método

(i) administrar una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto; y

(ii) administrar una segunda dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto,
en el que dicha segunda dosis comprende aproximadamente dos veces el número de partículas virales de dicha primera dosis.

La invención también proporciona una composición para su uso tal como se describió anteriormente en la que dicho uso comprende:

(i) administrar una primera dosis de dicha composición a dicho sujeto; y

(ii) administrar una segunda dosis de dicha composición a dicho sujeto,
en la que dicha primera dosis y dicha segunda dosis comprende cada una aproximadamente el mismo número de partículas virales.

La invención también proporciona una composición para su uso tal como se describió anteriormente en la que dicho uso comprende:

(i) administrar una primera dosis de dicha composición a dicho sujeto; y

(ii) administrar una segunda dosis de dicha composición a dicho sujeto,
en el que dicha segunda dosis comprende aproximadamente dos veces el número de partículas virales de dicha primera dosis.

La invención también proporciona un método de inducir una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, o un método de prevención de infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, o una composición para su uso en un método de ese tipo, comprendiendo el método

(i) administrar una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto; y
(ii) administrar una segunda dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto,
en el que dicha dosis comprende aproximadamente la mitad del número de partículas virales de dicha segunda dosis.
La invención también proporciona un método de inducir una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, o un método de prevención de infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, o una composición para su uso en un método de ese tipo, comprendiendo el método
(i) administrar una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto; y
(ii) administrar una segunda dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto,
en el que la razón del número de partículas virales en dicha primera dosis con respecto al número de partículas virales en dicha segunda dosis es 0.5:1.
La invención también proporciona un método de inducir una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, o un método de prevención de infección por SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método
(i) administrar una primera dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto; y
(ii) administrar una segunda dosis de una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto,
en el que la razón del número de partículas virales en dicha primera dosis con respecto al número de partículas virales en dicha segunda dosis es 1:2.
Los inventores quedaron muy sorprendidos por los efectos técnicos beneficiosos administrados por los regímenes de

inmunización de sensibilización-refuerzo y, en particular, el régimen de inmunización de dosis baja - dosis estándar (LD-SD) (es decir, dosis baja de sensibilización (0.5 x dosis), dosis estándar de refuerzo (1.0 x dosis)).
De manera adecuada, dicha segunda dosis se administra a un intervalo de
a) menos de 6 semanas,
b) 6 a 8 semanas,
c) 9 a 11 semanas, o
d) 12 semanas o más,
tras la administración de dicha primera dosis.
En una realización, de manera adecuada, dicha primera dosis comprende aproximadamente 2.5 x 10^{10} partículas virales. (LD)
En una realización, de manera adecuada, dicha primera dosis comprende aproximadamente 5 x 10^{10} partículas virales. (SD)
De manera adecuada, dicha segunda dosis comprende aproximadamente 5 x 10^{10} partículas virales. (SD)
En una realización, de manera adecuada, dicha primera dosis comprende aproximadamente 2.5 x 10^{10} partículas virales y dicha segunda dosis comprende aproximadamente 5 x 10^{10} partículas virales. (LD-SD)
En una realización, de manera adecuada, dicha primera dosis comprende aproximadamente 5 x 10^{10} partículas virales y dicha segunda dosis comprende aproximadamente 5 x 10^{10} partículas virales. (SD-SD)
De manera adecuada, se administra dicha composición por una vía de administración seleccionada de un grupo que consiste en intranasal, aerosol, intradérmica e intramuscular. De manera más adecuada, dicha administración es intramuscular.
APLICACIONES

La invención encuentra una aplicación particular en la prevención o contención de brotes de SARS-CoV2. En este escenario, es extremadamente ventajoso lograr inmunidad protectora con una sola dosis de vacuna. En las consideraciones especiales que se aplican a patógenos emergentes tal como el SARS-CoV2, normalmente no hay tiempo para administrar dos dosis. También es excepcionalmente difícil recordar a los pacientes su segunda dosis. Por ejemplo, los pacientes pueden tener muchas presiones en su tiempo que pueden impedir la asistencia para una segunda dosis. Por ejemplo, es posible que tengan que desplazarse desde lejos para recibir una dosis, o que necesiten ocuparse de sus medios de vida, lo que puede impedirles acudir a más de una dosis. Por tanto, existe la necesidad de un inicio rápido de la protección, necesidad que satisface la presente invención. La presente invención también permite de manera ventajosa evitar la cuarentena de pacientes entre dosis que de otro modo podrían ser necesarias, ya que adquirir la infección entre dosis sería potencialmente perjudicial para el individuo.

Por razones similares a las descritas anteriormente, es un beneficio técnico que la invención proporcione inmunidad protectora con una sola dosis.

De manera adecuada, el sujeto es un ser humano.

De manera adecuada, el método es un método de inmunización.

De manera adecuada, la respuesta inmune comprende una respuesta humoral. De manera adecuada, la respuesta inmune comprende una respuesta de anticuerpos. De manera adecuada, la respuesta inmune comprende una respuesta de anticuerpo neutralizante.

De manera adecuada, la respuesta inmune comprende una respuesta mediada por células. De manera adecuada, la respuesta inmune comprende inmunidad mediada por células (CMI). De manera adecuada, la respuesta inmune comprende inducción de células T CD8+. De manera adecuada, la respuesta inmune comprende inducción de una respuesta de células T citotóxicas CD8+ (CTL).

De manera adecuada, la respuesta inmune comprende tanto una respuesta humoral como una respuesta mediada por células. De manera adecuada, la respuesta inmune comprende inmunidad protectora.

De manera adecuada, la composición es una composición antigénica.

De manera adecuada, la composición es una composición inmunogénica.

De manera adecuada, la composición es una composición de vacuna.

De manera adecuada, la composición es una composición farmacéutica.

De manera adecuada, la composición se formula para la administración a mamíferos, de manera adecuada, a primates, de manera más adecuada, a seres humanos.

De manera adecuada, la composición se formula teniendo en cuneta su vía de administración. De manera adecuada, la composición se formula para ser adecuada para la vía de administración especificada. De manera adecuada, la composición se formula para ser adecuada para la vía de administración seleccionada por el operador o médico.

COVID19 es la enfermedad causada por el virus SARS-CoV2 en seres humanos. De manera adecuada, la invención se refiere además a un método para prevenir COVID19 en un sujeto,

comprendiendo el método administrar una composición tal como se describió anteriormente a dicho sujeto.

LIBERACIÓN DE LA BASE DE DATOS

Las secuencias depositadas en bases de datos pueden cambiar a lo largo del tiempo. De manera adecuada, se confía en la(s) base(s) de datos de la versión de secuencia actual. Alternativamente, se confía en la liberación vigente en la fecha de presentación.

Como sabe el experto, los números de registro pueden ser números de registro de versión/fecha. Los números de registro que se pueden citar para la entrada actual de la base de datos son los mismos que los anteriores, pero omiten el punto decimal y los dígitos posteriores.

GenBank es la base de datos de secuencias genéticas de los NIH, una colección anotada de todas las secuencias de ADN disponibles públicamente (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 EE. UU.; Nucleic Acids Research, enero de 2013; 41 (D1) : D36-42) y los números de registro proporcionados se refieren a esto, a menos que se indique lo contrario. De manera adecuada, se confía en la versión actual. De manera más adecuada, se confía en la divulgación disponible en la fecha de presentación efectiva. De manera más adecuada, la publicación de la base de datos de GenBank a la que se hace referencia es NCBI-GenBank Release 235: 15 de diciembre de 2019.

UniProt (Universal Protein Resource) es un catálogo completo de información sobre proteínas ('UniProt: a hub for protein information' Nucleic Acids Res. 43: D204-D212 (2015).). De manera adecuada, se confía en la versión

actual. De manera más adecuada, se confía en la divulgación disponible en la fecha de presentación efectiva. De manera más adecuada,, se confía en el consorcio UniProt European Bioinformatics Institute (EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics and Protein Information Resource (PIR), UniProt Knowledgebase (UniProtKB) Release 2020_01 del 26 de febrero de 2020.

VENTAJAS

La invención tiene la ventaja de la inmunidad protectora después de una dosis única (administración única).

Por tanto, es una ventaja que la invención proporcione respuestas inmunes protectoras después de una sola dosis.

La frase "respuesta inmune protectora" o "inmunidad protectora" tal como se usa en el presente documento significa que la composición puede generar una respuesta protectora en un organismo huésped, tal como un ser humano o un mamífero no humano, a quien se administra según la invención. De manera adecuada, una respuesta inmune protectora protege frente a la infección o enfermedad posterior causada por el SARS-CoV2.

Al considerar vacunas conocidas de diferentes áreas de enfermedades, tal como se observó anteriormente, existe una vacuna de vector viral de proteína de pico de ChAdOx1-MERS (documento WO2018/215766). Sin embargo, los inventores encontraron problemas al escalar la producción de esta vacuna de vector viral MERS (que no es parte de la invención). En primer lugar, las partículas virales de esta vacuna MERS no podrían producirse sin la represión de Tet. Dado que en el punto de escalamiento se requieren líneas celulares de calidad GMP para la fabricación, obtener una línea celular de calidad GMP con represión de Tet no fue un

asunto sencillo. Además, se obtuvo la línea celular a un coste considerable. Por tanto, además de la mano de obra y la experiencia adicionales necesarias para operar el sistema de represión de Tet, el alto costo de la línea celular es otro inconveniente de este método. Incluso cuando el virus se produjo usando este costoso sistema de represión de Tet, los inventores observaron problemas posteriores de inestabilidad. A los inventores les pareció que los posibles acontecimientos de deslizamiento en la secuencia de nucleótidos podrían estar contribuyendo a la inestabilidad, ya que observaron que solo el 15% del virus resultante tenía la secuencia/estructura genética correcta. Sin embargo, incluso cuando los inventores cambiaron los nucleótidos en la secuencia codificante en un intento de eliminar la posible inestabilidad basada en el deslizamiento, todavía existían problemas en la producción viral; por ejemplo, cuando el antígeno era correcto, los inventores observaron deleciones dentro de la secuencia promotora. Por tanto, se encontraron numerosas dificultades técnicas graves en la ampliación de la producción de la vacuna vectorizada viral ChAdOx1-MERS. Por todas estas razones, fue muy sorprendente para los inventores al modificar el casete de expresión génica de proteína de pico del SARS-CoV2 de la presente invención y obtener excelentes rendimientos incluso sin represión de Tet. Además, el inventor se sorprendió además al observar que la represión de Tet no era necesaria para la producción de la vacuna vectorizada viral de la presente invención. Estos resultados fueron completamente diferentes a la experiencia del inventor con la vacuna vectorizada viral ChAdOx1-MERS. Por tanto, el inventor quedó muy sorprendido por las

propiedades técnicas de la vacuna vectorizada viral de la presente invención, observando que los hallazgos experimentales mostraron que 6 de los 8 virus rescatados según la presente invención tenían la estructura/secuencia genética completamente correcta. Esto en sí mismo es un hallazgo notable que sorprendió el inventor con la alta estabilidad de su nuevo constructo.

Estas ventajas se derivan de la combinación de características particular que se expone en las reivindicaciones.

Para ChAdOx1 nCoV se permitirán aprobaciones rápidas.

Además, puede observarse que la vacuna MERS (vacuna del vector viral de proteína de pico de ChAdOx1-MERS (documento WO2018/215766)) se ha sometido a prueba en primates no humanos (NHP). Se ha publicado un desafío MERS NHP *(N. van Doremalen* et al*., (2020) Sci. Adv. 10.1126/sciadv.aba8399). Este documento muestra que la protección fue solo parcial después de una dosis de la vacuna MERS, y se requirieron dos dosis de la vacuna MERS para una buena protección. Se ha hecho referencia a la Figura 2A de N. van Doremalen* et al*. que en particular muestra que se requirieron 2 dosis, y también la Fig. 3B de N. van Doremalen et al.*

PROTEÍNA DE PICO

La proteína de pico (proteína S) es una proteína transmembrana tipo I grande. Esta proteína está altamente glicosilada y contiene numerosos sitios de N-glicosilación. Las proteínas de pico se ensamblan en trímeros en la superficie del virión para formar la distintiva "corona", o aspecto de corona. Los ectodominios de todas las proteínas de pico de CoV comparten la misma organización en dos dominios: un dominio N-terminal denominado ***S1*** *que es*

responsable de la unión al receptor y un dominio C-terminal ***S2*** *responsable de la fusión. La diversidad de CoV se refleja en las proteínas de pico variables (proteínas S).*
De manera adecuada, el antígeno es la proteína de pico de SARS-CoV2.
De manera adecuada, se usa la proteína de pico de longitud completa.
De manera adecuada, longitud completa significa que se incluye cada aminoácido de la proteína de pico.
Una proteína de pico a modo de ejemplo es tal como se da a conocer en SEQ ID NO: 1.
Puede ser posible usar solo el dominio S1 de la proteína de pico, o solo la parte soluble de la proteína de pico, o solo el dominio de unión al receptor de la proteína de pico. Sin embargo, de manera más adecuada, según la presente invención se usa la proteína de pico de longitud completa.
Al elegir la proteína de pico de longitud completa, se asegura ventajosamente la confirmación correcta de la proteína. Las proteínas truncadas pueden asumir conformaciones no naturales. Este inconveniente se evita usando la proteína de longitud completa.
Una ventaja adicional de usar la proteína de pico de longitud completa es que permite mejores respuestas de las células T. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se cree que cuantas más secuencias de aminoácidos estén presentes, más dianas potenciales habrá para las respuestas de las células T. Por tanto, de manera adecuada, cada aminoácido de la proteína de pico de tipo natural está incluido en el antígeno de la invención.
tPA

El tPA (activador tisular del plasminógeno), más específicamente la secuencia líder de tPA, se fusiona de forma adecuada con el antígeno de la proteína de pico del SARS-CoV2 de la invención. De manera adecuada, tPA se fusiona con el extremo N terminal de la secuencia de la proteína de pico.

De manera adecuada, la secuencia líder de tPA significa la secuencia de aminoácidos de tPA de SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 5

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRR

En lo anterior SEQ ID NO: 5 el 'RR' C terminal no es en realidad parte de la secuencia de tPA líder. Proviene de la fusión de dos sitios de restricción. De manera adecuada, la secuencia de tPA líder puede usarse con o sin el 'RR' C terminal, por ejemplo, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. De manera más adecuada, la secuencia se usa tal como se muestra en SEQ ID NO: 5.

La A subrayada es P en la secuencia líder de tPA de origen natural. La mutación P->A tiene la ventaja de la secreción de antígenos mejorada.

De manera adecuada, la secuencia líder de tPA puede usarse con o sin la mutación P->A. es decir, de manera adecuada, la secuencia líder de tPA puede usarse como SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 6

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRR

SEQ ID NO: 7 (=SEQ ID NO: 5 sin 'RR' C-terminal)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARF

SEQ ID NO: 8 (=SEQ ID NO: 6 sin 'RR' C-terminal)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARF

De manera más adecuada, la secuencia se usa con la mutación P->A (con o sin el 'RR' C terminal). De manera más adecuada, la secuencia se usa tal como se muestra en SEQ ID NO: 5.

Una secuencia de nucleótidos que codifica para tPA a modo de ejemplo, que ha sido optimizado con codones para uso de codones humanos, es tal como se muestra en SEQ ID NO: 9 (esta es la secuencia que codifica para SEQ ID NO: 5):

ATGGACGCCATGAAGAGGGGCCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTTGT GTCCGCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTCAGACGG

Se cree que el tPA promueve la secreción de proteínas a las que se fusiona. Se cree que el tPA aumenta la expresión de las proteínas a las que se fusiona. A pesar del mecanismo subyacente, la ventaja en la invención de fusionar tPA con el extremo N del antígeno proteína de pico es que se logra una inmunogenicidad mejorada. Por tanto, de manera más adecuada, el antígeno de la invención se proporciona como una fusión con tPA. De manera más adecuada, el tPA se fusiona con el extremo N terminal del antígeno de la proteína de pico.

De manera adecuada, el antígeno no comprende ninguna etiqueta de secuencia adicional.

De manera adecuada, el antígeno no comprende ninguna secuencia de enlace adicional.

Vectores virales basados en adeno

Los adenovirus son vectores atractivos para la vacunación humana. Tienen un genoma estable para que los insertos de genes foráneos no se eliminen y puedan infectar un gran número de células sin ninguna evidencia de mutagénesis por inserción.

El adenovirus defectuoso en la replicación puede modificarse por ingeniería mediante la deleción de genes del locus E1, que se requiere para la replicación viral, y estos virus pueden propagarse fácilmente con buenos rendimientos en líneas celulares que expresan E1 de AdHu5, tal como las células de riñón embrionario humano 293 (células HEK 293).

Las campañas de vacunación en masa anteriores en más de 2 millones de militares estadounidenses adultos que usaron adenovirus humanos vivos de serotipos 4 y 7 administrados por vía oral han mostrado buenos datos de seguridad y eficacia. Los adenovirus humanos están en desarrollo como vectores de vacunas contra la malaria, el VIH y la hepatitis C, entre otras. Se han usando ampliamente en ensayos en humanos con un excelente perfil de seguridad, principalmente como vectores para vacunas contra el VIH. Un factor limitativo para el uso generalizado de adenovirus humanos como vectores de vacunas ha sido el nivel de inmunidad antivectorial presente en seres humanos donde el adenovirus es una infección ubicua. La prevalencia de la inmunidad a los adenovirus humanos impulsó la consideración de los adenovirus de simio como vectores, ya que presentan estructuras de hexón homólogas a los adenovirus humanos. No se sabe que los adenovirus de simios causen enfermedades patológicas en humanos y la prevalencia de anticuerpos contra los adenovirus de origen chimpancé es inferior al 5% en seres humanos que residen en los EE. UU.

Puede usarse cualquier vector viral basado en adeno adecuado.

En más detalle, se puede usar cualquier vector viral de replicación deficiente, para uso humano, preferiblemente

derivado de un adenovirus no humano. Para uso veterinario, puede usarse Ad5.
ChAdOx2 es un ejemplo de un vector de adenovirus no humano adecuado para uso humano.
De manera más adecuada, el vector viral basado en adeno es ChAdOx1.
ChAdOx1
ChAdOx1 es un vector adenoviral de simio de replicación deficiente. La fabricación de vacunas puede lograrse a pequeña o gran escala. Los anticuerpos preexistentes frente al vector en seres humanos son muy bajos, y las vacunas inducen fuertes respuestas de células T y anticuerpos después de una dosis única, mientras que la falta de replicación después de la inmunización da como resultado un excelente perfil de seguridad en sujetos de todas las edades.
ChAdOx1 se describe en Dicks MDJ, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, et al. (2012) A Novel Chimpanzee Adenovirus Vector with Low Human Seroprevalence: Improved Systems for Vector Derivation and Comparative Immunogenicity. PLoS ONE 7(7): e40385, y en el documento WO2012/172277. Ambos de estos documentos se incorporan al presente documento como referencia, en particular para las enseñanzas específicas del vector ChAdOx1, incluyendo su construcción y fabricación.
Para la inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de pico, puede usarse de manera adecuada el sitio E1, de manera adecuada con el promotor hCMV IE. De manera adecuada, puede usarse la versión corta o larga; de manera más adecuada la versión larga tal como se describe en el documento WO2008/122811, que se incorpora

en el presente documento específicamente como referencia para la enseñanza de los promotores, particularmente el promotor largo.

También es posible insertar antígenos en el sitio E3, o cerca de las secuencias repetidas terminales invertidas, si se desea.

Además, un clon de ChAdOx1 que contiene GFP se deposita en el ECACC: una muestra de *E. coli* cepa SW1029 (un derivado de DH10B) que contiene cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que contienen el genoma clonado de AdChOX1 (pBACe3.6 AdChOx1 (E4 modificado) TIPeGFP, nombre de la línea celular "AdChOx1 (E4 modificado) TIPeGFP") se depositó por Isis Innovation Limited el 24 de mayo de 2012 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, Reino Unido en virtud del Tratado de Budapest y designado por el número de adhesión provisional 12052403. Isis Innovation Limited es el nombre anterior del propietario/solicitante de esta patente/solicitud.

ChAdOx2

La secuencia de nucleótidos del vector ChAdOx2 (con un casete Gateway™ en el locus
E1) se muestra en SEQ ID NO. 2 Este es un vector viral basado en el adenovirus C68 de chimpancé. (Esta es la secuencia de SEQ ID NO: 10 en la solicitud de patente GB número 1610967.0).

Además, un clon de ChAdOx2 que contiene GFP se deposita en la ECACC: el número de registro del depósito 16061301 fue depositado por Isis Innovation Limited el 13 de junio de 2016 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC)

en las Colecciones de Cultivos de la Agencia de Protección de la Salud, la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down , Salisbury SP4 0JG, Reino Unido en virtud del Tratado de Budapest. Isis Innovation Limited es el nombre anterior del propietario/solicitante de esta patente/solicitud.

ChAd63

En una realización, si se desea, puede usarse un vector de vacuna relacionado, ChAd63.

Producción de ChAdOx1 nCoV-19

ChAdOx1 nCoV-19 puede producirse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo ChAdOx1 nCoV-19 puede producirse tal como se describe en el Ejemplo 10.

En resumen, la proteína de pico (S) de SARS-Cov-2 (Genbank número de registro YP_009724390.1) se optimizó en codón para la expresión en líneas celulares humanas y se sintetizó por GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Se clonó la secuencia que codifica para los aminoácidos 2-1273 en un plásmido lanzadera después de la clonación InFusion (Clontech). El plásmido lanzadera codifica un promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus humano modificado (IE CMV) con sitios de operador de tetraciclina (TetO), señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH) y una secuencia de señal de tPA hacia 5` del gen insertado.

Para evitar dudas, “ChAdOx1 nCoV-19” significa el vector adenoviral ChAdOx1 tal como se describe en Dicks *et al*. (2012) PLoS ONE 7(7): e40385, y/o en el documento WO2012/172277, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 (tPA Líder 32aa fusionado con proteína de pico del SARS-Cov-2) insertada en el locus E1 del vector adenoviral ChAdOx1 bajo el control del promotor 'largo' de

CMV (citomegalovirus). Esta es una realización preferida de la invención.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN

En principio, puede usarse cualquier vía de administración adecuada.

La invención puede administrarse mediante la administración de aerosol a la vía respiratoria usando un dispositivo ampliamente disponible que se usa comúnmente para la administración de fármacos. Esta puede ser una vía de administración adecuada de vacunas para patógenos respiratorios como coronavirus. En una realización, la composición puede comprender una vacuna vectorizada por MVA, en la que la administración en aerosol puede dar como resultado fuertes respuestas inmunes en la vía respiratoria a dosis bajas. Una ventaja adicional de la administración de aerosol es evitar las agujas.

De manera adecuada, la vía de administración se selecciona del grupo que consiste en subcutáneo, intranasal, aerosol, nebulizador, intradérmico e intramuscular.

De manera adecuada, la vía de administración se selecciona de un grupo que consiste en intranasal, aerosol, intradérmica e intramuscular.

De manera adecuada, la vía de administración se selecciona de un grupo que consiste en intranasal, aerosol e intramuscular.

De manera más adecuada, la vía de administración se selecciona de un grupo que consiste en intranasal e intramuscular.

De manera más adecuada, la vía de administración es intramuscular.

La vía de administración puede aplicarse a seres humanos y/o otros mamíferos.

DOSIS

Debe observarse que existen maneras alternativas de describir la dosis de vectores adenovirales.

- Partículas virales – vp/mL. Esto se refiere al recuento de partículas virales totales administradas.
- Unidades infecciosas – i.u./mL. Esto se refiere al número de unidades infecciosas administradas, y puede correlacionarse con mayor precisión con la inmunogenicidad.

Por convención, los ensayos clínicos en el Reino Unido tienden a proporcionar la dosis en términos de partículas virales.

Las dosis preferidas según la presente invención son:

Para los seres humanos, en una realización, el rango es desde 10^9 hasta 10^{11} partículas virales.

Para los seres humanos, en una realización, el rango es desde 2.5x 10^{10} pv hasta 5x 10^{10} vp.

Para los seres humanos, en una realización, la(s) dosis/rango de dosis puede(n) derivarse de los ejemplos a continuación.

De manera adecuada, no se administra adyuvante con el vector viral de la invención.

De manera adecuada, el vector viral de la invención se formula con tampón simple. Un tampón a modo de ejemplo puede ser tal como se muestra a continuación en el encabezado ‘Formulación’.

CARACTERÍSTICAS ADICIONALES

De manera adecuada, la secuencia de ácido nucleico tiene un codón optimizado para el uso de codones de mamíferos, de manera más adecuada para el uso de codones humanos.
De manera adecuada, se proporciona un envase que contiene una composición tal como se describió anteriormente . De manera adecuada, dicho envase puede ser un vial. De manera adecuada, dicho envase puede ser una jeringa.
De manera adecuada, se proporciona un nebulizador que contiene una composición tal como se describió anteriormente.
De manera adecuada, se proporciona un aplicador nasal que contiene una composición tal como se describió anteriormente.
De manera adecuada, se proporciona un inhalador que contiene una composición tal como se describió anteriormente.
De manera adecuada, se proporciona un contenedor presurizado que contiene una composición tal como se describió anteriormente.
Se proporciona un método para preparar una composición tal como se describió anteriormente, comprendiendo dicho método preparar un ácido nucleico que codifica para la proteína de pico de SARS-CoV2, opcionalmente fusionada con la proteína tPA, e incorporar dicho ácido nucleico en un vector viral basado en adeno, adecuadamente un vector ChAdOx1. De manera adecuada, el ácido nucleico está operativamente unido a un promotor adecuado para inducir la expresión de dicha proteína de pico del SARS-CoV2 (o proteína de fusión SARS-CoV2-proteína de pico-tPA) cuando se encuentra en una célula de mamífero tal como una célula humana.
FORMULACIÓN

La formulación de la vacuna puede ser líquida, adecuadamente estable durante al menos 1 año a 2-8°C, o puede estar liofilizada, adecuadamente estable a temperatura ambiente, por ejemplo, temperatura ambiente 18-22°C.

El tampón de formulación ChAdOx1, tal como se usa para el producto clínico, es:

COMPONENTES DE TAMPÓN DE FORMULACIÓN

1. Histidina 10 mM
2. Sacarosa al 7.5%
3. Cloruro de sodio 35 mM
4. Cloruro de magnesio 1 mM
5. Polisorbato 80 al 0.1%
6. EDTA 0.1 mM
7. Etanol al 0.5%
8. Ácido clorhídrico (para ajuste del pH a ~pH 6.6)

Formulado en Agua para Inyección Ph Eur.

Las formulaciones para otras vías de administración tales como aerosol se ajustarán en consecuencia por el operador experto.

De manera adecuada, la composición y/o formulación no comprende adyuvante. De manera adecuada, se omite el adyuvante de la composición y/o formulación de la invención.

REALIZACIONES ADICIONALES

Tal como se observó anteriormente, puede ser posible usar solo el dominio S1 de la proteína de pico, o solo la parte soluble de la proteína de pico, o solo el dominio de unión al receptor de la proteína de pico.

En una realización, la proteína de pico puede proporcionarse como una proteína de pico truncada que comprende la sección del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína de pico. De manera más adecuada, la proteína de pico puede proporcionarse como un constructo que consiste esencialmente en la parte de RBD de la proteína de pico. De manera más adecuada, la proteína de pico puede proporcionarse como un constructo que consiste solo en la sección de RBD de la proteína de pico.

Por tanto, en una realización se usa solo el dominio de unión al receptor de la proteína de pico. De manera adecuada, esto tiene la fusión de tPA.

En esta realización, de manera adecuada, la proteína de pico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12, que presenta la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor del pico de tPA (secuencia de tPA subrayada):

SEQ ID NO: 12

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRK
RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQT
GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQ
AGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTN.

En esta realización , de manera adecuada, la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de pico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13, que presenta secuencia de nucleótidos tal como se revisa por el inventor (tras la optimización de codones, se introdujeron ejecuciones de las mismas bases y después de que esas ejecuciones de las mismas bases se revisaron para conservar la misma secuencia de codificación pero eliminar las repeticiones) que codifica para el dominio de unión al receptor de la

proteína de pico del SARS-CoV2 con tPA (secuencia de codificación de tPA subrayada)

SEQ ID NO: 13:

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGTTTGT
GTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGACCGAATATCACCAATCTGTGCC
CATTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAG
CGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCAC
CTTCAAGTGCTACGGCGTGTCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGT
ACGCCGACAGCTTCGTGATCCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACA
GGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGC
CTGGAACAGCAACAACCTGGATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGC
TGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAG
GCCGGCAGCACACCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTC
CTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGA
GCTTCGAGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATTAA

En una realización, la proteína de pico puede proporcionarse como una "forma previa a la fusión". Por tanto, en una realización se usa una versión 'previa a la fusión' de la proteína de pico.

De manera adecuada, esto tiene la fusión de tPA.

En esta realización, de manera adecuada, la proteína de pico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 14, que presenta secuencia de aminoácidos de la proteína de prefusión de pico tPA (secuencia de tPA subrayada)

SEQ ID NO: 14

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAY
TNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFN
DGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYS
KHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA
YYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPT

ESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGV
SPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNL
DSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPT
NGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKF
LPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQ
TNSPGSASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSV
DCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIK
DFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQK
FNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ
NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE
CVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFP
REGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFK
EELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ
YIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKG
VKLHYT

En esta realización , de manera adecuada, la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de pico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15, que presenta secuencia de nucleótidos tal como se revisa por el inventor (tras la optimización de codones, se introdujeron ejecuciones de las mismas bases y después de que esas ejecuciones de las mismas bases se revisaron para conservar la misma secuencia de codificación pero eliminar las repeticiones) que codifica para la proteína de prefusión de pico del SARS-CoV2 con tPA (secuencia de tPA subrayada)

SEQ ID NO: 15

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGTTTGT
GTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTCCTGGTGCTGCTGC
CACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAGGACACAGCTGCCTCCAGCCTAC

ACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACCCAGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCT

GCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCA

TCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCAGTGCTGCCCTTCAAC

GACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGG

CACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGG

TCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCATTCCTGGGCGTCTACTACCAC

AAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTG

CACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACT

TCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGC

AAGCACACACCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACC

ACTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGC

ACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCCGCTGCC

TACTATGTGGGATACCTGCAGCCTCGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCAC

CATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGA

AGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACC

GAATCCATCGTGCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAA

TGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGG

CCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTG

TCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGAT

CCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACA

ACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTG

GATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCT

GAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACACCTTGTA

ACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACA

AATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCATGC

TCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGA

ACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTC

CTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGATGCCGTCAGAGATCC

TCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACACCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCA

CGCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACC

GAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCAC

CGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACA
ATAGCTACGAGTGCGACATCCCTATCGGCGCTGGCATCTGCGCCTCTTACCAGACACAG
ACAAACAGCCCTGGCAGCGCCTCTTCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAAT
GTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCGACCA
ACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTG
GACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTA
CGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACA
AGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACGCCTCCTATCAAG
GACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCG
GAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCA
AGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAG
TTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACAC
ATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCTGCCC
TGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAG
AATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAA
GATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCA
ACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCTAGCAACTTCGGCGCC
ATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAAGCCGAGGTGCA
GATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGC
TGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAG
TGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAG
CTTCCCTCAGTCTGCGCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATACGTGCCCGCTC
AAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCT
AGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACCCAGCGGAACTTCTA
CGAGCCTCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGA
TCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAA
GAGGAACTGGATAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCTGACGTGGACCTGGGCGATAT
CAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGG
TGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGCAAGTACGAGCAG
TACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTT

GTAGCTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGC GTGAAACTGCACTACACCTGATAA

VARIACIÓN DE SECUENCIA

De manera adecuada, la secuencia es, o se deriva de, secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento, tal como SEQ ID NO. 1. Puede tolerarse un grado de variación de secuencia. De manera adecuada, la secuencia usada en el vector de la invención comprende secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de referencia proporciona como SEQ ID NO. 1.

El nivel de identidad de secuencia del 99% en comparación con SEQ ID NO. 1 (que tiene 1272 aminoácidos) corresponde a aproximadamente 12 a 13 sustituciones en toda la longitud de la secuencia de la proteína de pico proporcionada como SEQ ID NO. 1. De manera adecuada, el constructo de proteína de pico usado tiene 13 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 12 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 10 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 8 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 6 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 4 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, 2 o menos sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 1, , de manera adecuada, una sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1.

De manera adecuada, cualquier sustitución de aminoácidos no está en el dominio de unión al receptor. De manera

adecuada, cualquier sustitución de aminoácidos está fuera del dominio de unión al receptor.
De manera adecuada, el recuento de sustituciones no incluye la adición de la secuencia de tPA.

PROTEÍNA DE PICO DEL SARS-CoV2 – MVA

Se ha dado a conocer un vector de MVA que porta la proteína de pico del SARS-CoV2. El vector MVA descrito en el presente documento presenta un sistema de promotor mH5/F11 en una realización, o se basa en un promotor F11 estándar en otra realización. En cualquier caso, estos sistemas promotores se conocen en la técnica, por ejemplo, en la patente publicada US 9,273,327B2 (Cottingham - concedida el 1 de marzo de 2016 - 'Poxvirus Expression System') - este documento se incorpora en el presente documento como referencia, en particular para las enseñanzas específicas del/de los promotor(es) para su uso en el presente documento.
En el contexto de la presente invención, el vector MVA que administra la proteína de pico del SARS-CoV2 se enseña como un refuerzo opcional útil en un régimen de inmunización tal como se describe. La primera dosis debería ser preferiblemente proteína de pico del ChAdOx1-SARS-CoV2 (que comprende más preferiblemente la fusión de tPA al N-terminal de la proteína de pico) y la segunda administración opcional incluye preferiblemente la proteína de pico del MVA-SARS-CoV2.
Tal como resultará evidente, el objetivo principal de la invención es la provisión de una dosis única de vacuna contra el SARS-CoV2. Sin embargo, en esta realización que presenta una segunda administración (de refuerzo), preferiblemente la segunda administración (de refuerzo) es

en un vector viral diferente, es decir, un régimen de "sensibilización-refuerzo" heterólogo. De manera adecuada, la segunda administración (dosis de refuerzo) comprende un vector de MVA. Esto encuentra una aplicación particular, por ejemplo, en la inducción de inmunidad en sujetos como los trabajadores sanitarios. Es un problema particular que los trabajadores sanitarios puedan contraer una infección por SARS-CoV2. Puesto que normalmente ellos mismos gozan de buena salud, esto tiene muy poco efecto, si es que tiene alguno, en su salud general. Sin embargo, cuando están infectados, por supuesto, pueden excretar virus, que pueden infectar a pacientes inmunocomprometidos que están bajo su cuidado con consecuencias desastrosas. Por tanto, existe un problema especial y particular en la inmunización de los trabajadores sanitarios. Se desea una inmunidad duradera para estos profesionales. Por tanto, aunque es un principio fundamental de la invención que una dosis única de vacuna proporcione protección contra la infección por SARS-CoV2, en el caso especial de los trabajadores sanitarios se desea que la inmunidad protectora dure lo más posible en el futuro. Para la mayoría de las aplicaciones, una inmunidad temporal ("temporal" en contraste con una inmunidad de por vida) es totalmente adecuada para proteger al individuo y/o detener la propagación de la infección. Sin embargo, en el caso especial de los trabajadores sanitarios, cualquier forma de extender su inmunidad en el tiempo es en sí misma una ventaja adicional. En este escenario, se ha enseñado un régimen de "sensibilización-refuerzo" que comprende una primera administración de un vector adenoviral, una composición de SARS-CoV2, como una composición de ChAdOx-SARS-CoV2, seguida de una segunda administración (de

refuerzo) de un vector viral que comprende la proteína de pico del SARS-CoV2, tal como un vector de MVA que expresa la proteína de pico del SARS-CoV2. Por tanto, en la opinión de los inventores, la proteína de pico del MVA-SARS-CoV2 tiene uso limitado pero puede encontrar una aplicación particular como un refuerzo heterólogo después de una vacunación de sensibilización con proteína de pico del ChAdOx-SARS-CoV2. En una realización, el orden de las inmunizaciones puede invertirse de modo que la vacuna MVA-SARS-CoV2 se administre primero, seguida de la vacuna ChAdOx-SARS-CoV2 después de un intervalo de normalmente 1 a 8 semanas.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método de inducir una respuesta inmune frente a SARS-CoV2 en un sujeto mamífero, comprendiendo el método

(i) administrar una composición que comprende un vector viral, comprendiendo el vector viral ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína de pico del SARS-CoV2, caracterizada porque dicho vector viral es un vector basado en adenovirus a dicho sujeto, y

(ii) administrar una composición que comprende un vector viral, comprendiendo el vector viral ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos que codifica para la proteína de pico del SARS-CoV2, caracterizada porque dicho vector viral es un vector basado en MVA a dicho sujeto.

De manera adecuada, la etapa (i) es una composición de sensibilización.

De manera adecuada, la etapa (ii) es una composición de refuerzo.

De manera adecuada, la etapa (ii) se lleva a cabo 1-8 semanas tras la etapa (i), de manera más adecuada, 4 semanas tras la etapa (i).

Los aspectos particulares y preferidos adicionales se exponen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con las características de las reivindicaciones independientes, según sea apropiado, y en combinaciones distintas de las expuestas explícitamente en las reivindicaciones.

Cuando una característica del aparato se describe como operable para proporcionar una función, se apreciará que esto incluye una característica del aparato que proporciona esa función que está adaptada o configurada para proporcionar esa función.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención ahora se describirá a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La Figura 1 muestra un gráfico de barras

La Figura 2 muestra un gráfico de barras

La Figura 3 muestra un gráfico de barras

La Figura 4 muestra diagramas

La Figura 5 muestra diagramas

La Figura 6 muestra una mapa de ADN de ChAdOx1 nCoV-19

La Figura 7 muestra diagramas/gráficos de barras

La Figura 8 muestra diagramas/gráficos de barras

La Figura 9 muestra gráficos

La Figura 10 muestra gráficos

La Figura 11 muestra diagramas

La Figura 12 muestra un gráfico de barras

La Figura 13 muestra las respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 S después de regímenes de vacunación de sensibilización sola y sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones y cerdos.
La Figura 14 muestra las respuestas de anticuerpo específicas de la proteína del SARS-CoV-2 S después de regímenes de vacunación de sensibilización sola y sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones y cerdos.
La Figura 15 muestra gráficos de barras. Se solicitaron reacciones adversas locales (15A) y sistémicas (15B) en los primeros 7 días posteriores a la vacunación, según se registró en los diarios electrónicos de síntomas de los participantes. P= Período de observación de 60 minutos después de la vacunación en la clínica; El día 0 es el día de la vacunación. Fiebre: Sensación de fiebre autoinformada, Temperatura de la fiebre: mediciones objetivas de fiebre, leve: >= 38°C, moderada: >=38.5°C, grave: >=39.0°C
La Figura 16 muestra gráficos de barras. Se solicitaron reacciones adversas locales (16A) y sistémicas (16B) en los primeros 7 días posteriores a la sensibilización y dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en un subconjunto no aleatorizado de 10 participantes. P= Período de observación de 60 minutos después de la vacunación en la clínica; El día 0 es el día de la vacunación. Fiebre: Sensación de fiebre autoinformada, Temperatura de la fiebre: mediciones objetivas de fiebre, leve: >= 38°C, moderada: >=38.5°C, grave: >=39.0°C
La Figura 17 muestra gráficos. Respuesta de IgG de SARS-CoV-2 mediante ELISA interno estandarizado para aumentar la

proteína en los participantes del ensayo y pacientes convalecientes con PCR+ COVID-19. Rojo (medio): Receptores de ChAdOx1 nCoV-19; Azul (Izquierdo): Receptores MenACWY, Verde (derecho): sueros convalecientes de pacientes con PCR+ COVID-19. Las barras de error muestran la mediana y el IQR. Los participantes en el grupo de refuerzo recibieron la segunda dosis el día 28.

La Figura 18 muestra gráficos. Respuesta multiplex de IgG SARS-CoV-2 mediante ELISA a 18A) proteína de pico y dominio de unión al receptor 1B), en participantes del ensayo y pacientes convalecientes con PCR+ COVID-19 (plataforma MSD Mesoscale). Rojo: Receptores de ChAdOx1 nCoV-19; Azul: Receptores MenACWY, Verde: sueros convalecientes de pacientes con PCR+ COVID-19. Las barras de error muestran la mediana y el IQR. Las muestras del día 42 tomadas en N = 9 participantes se reforzaron el día 28.

La Figura 19 muestra diagramas. Respuesta de IFNg ELISpot a péptidos que abarcan la proteína de pico del SARS-CoV-2, SFC: Células formadoras de manchas, PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, las barras de errores muestran medianas y rangos intercuartílicos. LLD es 48 SFC

La Figura 20 muestra un diagrama. Ensayo de neutralización de pseudotipo (Monograma) Azul: Receptores de MenACWY, Rojo: Receptores de ChAdOx1 nCoV-19. Verde (extrema derecha): sueros convalecientes de casos de COVID-19 (CONV). Las líneas continuas conectan muestras del mismo participante. Muestras del día 35 y del día 42 de los participantes que recibieron una dosis de refuerzo el día 28

La Figura 21 muestra diagramas. Ensayos de neutralización del SARS-CoV-2 vivo

Paneles superiores: Neutralización del virus vivo del SARS-CoV-2 (ensayo IC100 - Marburg)
Parte Izquierda Inferior: Microneutralización (MNA) de SARS-CoV-2 vivo (IC50 - Public Health England) y parte derecha inferior: Ensayo del título de neutralización por reducción de placa (PRNT) (IC50 - Public Health England). Azul: Receptores de MenACWY, Rojo: Receptores de ChAdOx1 nCoV-19. Grupo 1: Grupo de solo sensibilización, Grupo 3: Grupo de sensibilización-refuerzo (reforzado el día 28). Las líneas continuas conectan muestras del mismo participante. La línea punteada muestra los límites superior e inferior de detección. CONV: sueros de convalecientes de casos de COVID-19, HCW+: Sueros de trabajadores sanitarios que dieron positivo al inicio por ELISA.
La Figura 22 muestra un diagrama del perfil de ensayo.
La Figura 23 muestra un diagrama del efecto del paracetamol profiláctico en las reacciones locales solicitadas en los primeros 2 días después de la vacunación con A) ChAdOx1 nCoV-19, B) MenACWY. * Las razones de probabilidad se ajustaron por edad, sexo, ocupación (trabajador de la salud o no), tabaquismo, consumo de alcohol e IMC
La Figura 24 muestra diagramas. El efecto del paracetamol profiláctico en las reacciones sistémicas solicitadas en los primeros 2 días después de la vacunación con A) ChAdOx1 nCoV-19, B) MenACWY. * Las razones de probabilidad se ajustaron por edad, sexo, ocupación (trabajador de la salud o no), tabaquismo, consumo de alcohol e IMC
La Figura 25 muestra gráficos.
La Figura 26 muestra gráficos de reacciones adversas locales solicitadas en los 7 días posteriores a la

sensibilización o refuerzo con vacuna de dosis estándar por edad en relación con el Ejemplo 16, en el que el día 0 es el día de vacunación. Los participantes que se muestran son los asignados al azar para recibir 2 dosis; las reacciones adversas se registraron en los diarios electrónicos de los síntomas de los participantes;

La Figura 27 muestra gráficos de reacciones adversas sistémicas solicitadas en los 7 días posteriores a la sensibilización o refuerzo con vacuna de dosis estándar por edad en relación con el Ejemplo 16. El días 0 es el día de la vacunación. Febril: Sensación de fiebre autoinformada, Fiebre: mediciones objetivas de fiebre, leve: >= 38°C, moderada: >=38.5°C, grave: >=39.0°C. Los participantes mostrados son los asignados al azar para recibir 2 dosis. Se registraron las reacciones adversas en los diarios electrónicos de los síntomas de los participantes;

La Figura 28 muestra gráficos de títulos de anticuerpos neutralizantes medidos en el ensayo de neutralización de virus pseudotipado (Monograma) después de la vacunación de sensibilización y refuerzo por edad y dosis de vacuna en relación con el Ejemplo 16. Rojo: Receptores de ChadOx1 nCoV-19, Azul: Receptor de MenACWY. La línea punteada es el límite inferior del ensayo (40). Solo se muestran los participantes asignados para recibir dos dosis. Comparación de los títulos del día 42 en los grupos de edad que recibieron la misma dosis, por ANOVA aplicado a valores transformados de $\log_2$: Dosis baja, p= 0.2440 , Dosis alta, p=0.6555. Comparación de los títulos del día 42 en los grupos de dosis en cada cohorte de edad, mediante la prueba de la t de muestras independientes aplicada a los valores

transformados log2: 18-55, p= 0.5115, 56-69, p= 0.4516, 70+, p= 0.7664.

La Figura 29 muestra un gráfico de la respuesta ELISpot de interferón-γ a péptidos que abarcan el inserto de pico de SARS-CoV-2 después de la vacunación de sensibilización y refuerzo por grupo de edad y dosis de vacuna en relación con el Ejemplo 16. Azul: Receptores de MenACWY, Rojo: Receptores de ChAdOx1 nCoV-19. Las líneas continuas conectan muestras del mismo participante. SFC: Células formadoras de manchas, PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, los recuadros muestran medianas y rangos intercuartílicos. LLD es 48 SFC/M (linea punteada). Las muestras del día 42 son de participantes que recibieron una dosis de refuerzo el día 28. Los datos también se muestran en la Tabla S2 para ambas dosis únicas y dos grupos de dosis con números analizados en cada punto de tiempo.

La Figura 30 muestra gráficos de la respuesta de IgG de SARS-CoV-2 a la proteína de pico y al dominio de unión al receptor por edad y dosis de vacuna medida usando un inmunoensayo multiplex (MIA) relacionado con el Ejemplo 16. Paneles superiores: Grupos de vacunas de dosis alta, paneles inferiores: Grupos de vacuna de dosis baja, RBD: dominio de unión al receptor; Pico: Proteína de pico del SARS-COV-2. Los participantes en el grupo de refuerzo recibieron su segunda dosis el día 28 (linea punteada). El gráfico muestra la mediana y el rango intercuartílico. No se muestran los grupos de control

La Figura 31 muestra gráficos de títulos de anticuerpos neutralizantes medidos usando un ensayo de microneutralización de virus vivo SARS-CoV-2 (PHE-MNA80) después de la vacunación de sensibilización y refuerzo por

edad y dosis de vacuna en relación con el Ejemplo 16. Panel superior: Grupos de vacunas de dosis alta, panel inferior: Grupos de vacunas de dosis baja, participantes en el grupo de refuerzo recibieron la segunda dosis el día 28. El gráfico muestra la mediana y el rango intercuartílico. No se muestran los grupos de control. Para normalizar los datos entre las ejecuciones del ensayo, se incluyó una muestra de referencia en todas las ejecuciones de ensayo y las muestras de prueba se normalizaron a este valor mediante la generación de relaciones log10. Las líneas punteadas muestran los límites superior e inferior del ensayo (valores fuera de este rango establecidos en 640 y 5 respectivamente).

La Figura 32 muestra gráficos de la respuesta Multiplex SARS-CoV-2 IgG por inmunoensayo multiplex después de la Sensibilización-Refuerzo en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 33 muestra gráficos de microneutralización de SARS-CoV-2 vivo después de la Sensibilización-Refuerzo en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 34 muestra gráficos de respuestas de isotipo de inmunoglobulina específica de pico de SARS-CoV-2 inducidas por regímenes de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 35 muestra gráficos de respuestas de subclase de IgG específica de pico de SARS-CoV-2 inducidas por regímenes de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 36 muestra la fagocitosis de monocitos dependiente de anticuerpos (A) y la fagocitosis de neutrófilos (B), la deposición del complemento (C) y la activación de células asesinas naturales (D) en

participantes del ensayo, plasma convaleciente y plasma prepandémico y funcionalidad de anticuerpos dependiente de Fc longitudinal en receptores de la vacuna ChAdOx1-nCoV19, pacientes convalecientes de COVID-19 y muestras prepandémicas en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 37 muestra gráficos de la respuesta de ELISpot de IFNγ a péptidos que abarcan el inserto de vacuna de pico del SARS-CoV-2 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 38 muestra gráficos de anticuerpos neutralizantes medidos en el ensayo de pseudovirus (Monograma IC50) en relación con el Ejemplo 17.

La Figura 39 muestra la activación de poblaciones de linfocitos después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 en relación con el Ejemplo 18.

La Figura 40 muestra las respuestas de isotipo de inmunoglobulina inducidas por la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 o MenACWY en relación con el Ejemplo 18.

La Figura 41 muestra las respuestas de la subclase de IgG inducidas por una dosis única o un régimen de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en relación con el Ejemplo 18.

La Figura 42 muestra: Respuestas de IFNγ ELISPOT a grupos de péptidos de 15 meros que cubren la vacuna ChAdOx1-nCOV19 en relación con el Ejemplo 18.

La Figura 43 muestra el cambio de veces en SFC para cada grupo de péptidos para cada participante vacunado con ChAdOx1 desde el inicio (D0) hasta D14 después de la vacunación en relación con el Ejemplo 18.

La Figura 44 muestra las respuestas de las células T a los péptidos de pico del SARS-CoV-2 medidas por citometría de

flujo con tinción de citocinas intracelulares en relación con el Ejemplo 18.

La **Figura 45** muestra la mediana de Cryo-ET y subtomograma del pico derivado de ChAdOx1 nCoV-19. (A) Corte tomográfico de célula U2OS transducida con ChAdOx1 nCoV-19. El corte tiene un grosor de 6.4 Å; PM = membrana plasmática, barra de escala = 100 nm **(B)** Vista detallada del área encuadrada marcada en **(A)**. Las puntas de flecha blancas indican proteínas de pico en la superficie celular; barra de escala = 50 nm. **(C-E)** Promedio del subtomograma de 9.6 Å del pico derivado de ChAdOx1 nCoV-19 mostrado en la vista lateral **(C)**, vista superior **(D)** y sección transversal **(E)**. Modelo atómico de SARS-CoV-2 S (PDB ID: 6VXX) se ajustó como referencia.

La **Figura 46** muestra el procesamiento de glicanos específicos del sitio de SARS-CoV-2 S tras la infección con ChAdOx1 nCoV-19. **(A)** Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de proteínas de pico del SARS-CoV-2, usando anticuerpos anti-S1 y anti-S1+S2. Carril 1= Gránulo de proteína de lisados de la célula 293F infectados con ChAdOx1 nCoV-19. Carril 2= Gránulo de proteína reducido de 293F infectada con ChAdOx1 nCoV-19. Carril 3=proteína del SARS-CoV-2 S estabilizada con 2P. Los recuadros blancos corresponden a bandas de gel que se cortaron para análisis espectrométrico de masas. **(B)** Glicosilación unida a N específica del sitio de las glicoproteínas del SARS-CoV-2 S0 y S1/S2. Análisis LC-MS. Los gráficos de barras representan las cantidades relativas de glicopéptidos digeridos que tienen los identificadores de oligomanosa/glicanos de tipo híbrido (verde), glicanos de tipo complejo (rosa) y PNG desocupados (gris) en cada secuencia de glicanos unidos a N en la proteína S, enumerados

desde el extremo terminal N al C. **(C)** Modelo glicosilado del pico de SARS-CoV-2 escindido (S1/S2). Los gráficos circulares resumen el análisis espectrométrico de masas cuantitativo de las poblaciones de glicanos unidos a N de oligomanosa/híbrida (verde), compleja (rosa) o desocupada (gris). Los glicanos representativos se modelan sobre la estructura de prefusión de la glicoproteína del SARS-CoV-2 S trimérica (ID de PDB: 6VSB), con un RBD en la conformación "arriba". Los glicanos modelados se colorean según el contenido de oligomanosa/glicano híbrido con sitios de glicanos marcados en verde (80-100%), naranja (30-79%), rosa (0-29%) o gris (no detectado).

La **Figura 47** muestra una estrategia de sensibilización-refuerzo que mejora la respuesta de las células T CD8 frente a ChAdOx1 nCoV-19 en ratones envejecidos. **a**. Esquema de la estrategia de inmunización de sensibilización. Porcentaje de células T $CD8^+$ $Ki67^+$ (**b**), $CXCR3^+$ (**c**), memoria efectora $CD44^+CD62L^-$ (**d**) y memoria central $CD44^+CD62L^+$ (**e**) en el ganglio linfático aórtico de drenaje de ratones de 3 meses de edad (3 meses) o 22 meses de edad (22 meses) nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **f**. Porcentaje de células T $CD8^+$ esplénicas $Ki67^+$ en ratones de 3 meses de edad (3 meses) o 22 meses de edad (22 meses) nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **g-h**. Número de células $CD8^+$ que producen granzima B (GZMB), IFNγ, IL-2 o TNFα seis horas tras la reestimulación con grupos de péptidos SARS-CoV-2, en (g) y el número de células T CD8 productoras de citocinas simples y dobles se representan en gráficos de barras apiladas. Se toman células de bazo de ratones de 3 meses (3 meses) o 22 meses (22 meses) nueve días después de la inmunización con

ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **i.** Esquema de la estrategia de inmunización de sensibilización-refuerzo. Porcentaje de células T $CD8^+$ de $Ki67^+$ (**j**), $CXCR3^+$ (**k**), memoria efectora $CD44^+CD62L^-$ (**l**) y memoria central $CD44^+CD62L^+$ (**m**) en el ganglio linfático aórtico de drenaje de ratones de 3 meses de edad o 22 meses de edad nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **n.** Porcentaje de células T $CD8^+$ esplénicas $Ki67^+$ en proliferación en ratones de 3 meses de edad o 22 meses de edad nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. Número de células $CD8^+$ productoras de granzima B (**n**) o IFNγ (**o**) seis horas tras la reestimulación con grupos de péptido de SARS-CoV-2, en (**p**) y y el número de células T CD8 productoras de citocinas simples y dobles se representa en gráficos de barras apiladas. Se toman células de bazo de ratones de 3 meses de edad o 22 meses de edad nueve días después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. La altura de la barra en **b-g**, **j-o** corresponde a la mediana y cada círculo representa una réplica biológica. En **h**, **p**, cada segmento de barra representa la media y las barras de errores, la desviación estándar. Se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos son consistentes con una distribución normal, seguida de o bien una prueba ANOVA ordinaria unidireccional para datos con una distribución normal o bien una prueba de Kruskal Wallis para datos no distribuidos normalmente junto con una prueba de comparaciones múltiple. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n = 4-8 por grupo/experimento).

La **Figura 48** muestra la respuesta de las células T CD4 frente a ChAdOx1 nCoV-19 en ratones envejecidos. **a.** Esquema

de la estrategia de inmunización de sensibilización. Porcentaje de células T $Ki67^+$ (**b**), $CXCR3^+$ $CD44^+$ CD4 en proliferación (**c**) y células Treg $CXCR3^+$ $CD44^+$ $Foxp3^+$ (**d**) en el ganglio linfático aórtico de drenaje. Porcentaje de células T $Ki67^+$ (e), $CXCR3^+$ $CD44^+$ CD4 en proliferación (**f**) y células Treg $CXCR3^+CD44^+Foxp3^+$ (**g**) en el bazo de ratones de 3 meses de edad o 22 meses de edad nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **h**, **i**. Número de células CD4 + Foxp3- que producen IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 o TNFα seis horas después de la restimulación con grupos de péptidos SARS-CoV-2, en (i) y el número de múltiples células T CD4 productoras de citocinas se representan en gráficos de barras apilados. **j**. Esquema de la estrategia de inmunización de sensibilización-refuerzo. Porcentaje de células T $Ki67^+$ (**k**), $CXCR3^+$ $CD44^+$ CD4 en proliferación (**l**) y células Treg $CXCR3^+$ $CD44^+$ $Foxp3^+$ (**m**) en el ganglio linfático aórtico de drenaje. Porcentaje de células T $Ki67^+$ $CD44^+$ (**n**), $CXCR3^+CD44^+$ $CD4^+Foxp3^-$ (**o**) y células Treg $CXCR3^+$ $CD44^+$ $Foxp3^+$ (**p**) en el bazo de ratones de 3 meses de edad o 22 meses de edad nueve días tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. **q**, **r**. Número de células $CD4^+$ $Foxp3^-$ productoras de IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 o TNFα seis horas tras la la reestimulación con grupos de péptidos de SARS-CoV-2, en (r) y el número de múltiples células T CD4 productoras de citocinas se representan en gráficos de barras apilados. La altura de la barra corresponde a la mediana y cada círculo representa una réplica biológica. En **i**, **r**, cada segmento de barra representa la media y las barras de errores, la desviación estándar. Se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos son consistentes con una

distribución normal, seguida de o bien una prueba ANOVA ordinaria unidireccional para datos con una distribución normal o bien una prueba de Kruskal Wallis para datos no distribuidos normalmente junto con una prueba de comparaciones múltiple. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n = 4-8 por grupo/experimento).

La **Figura 49** muestra respuestas de células B deterioradas tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 de ratones envejecidos. La respuesta de células B en ratones de 3 meses (3 meses) o 22 meses (22 meses) nueve días después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS. Evaluación citométrica de flujo del porcentaje (**a**) y número (**b**) de células plasmáticas en el ganglio linfático aórtico. **c**. Gráficos circulares que muestran la proporción de células plasmáticas IgM^+ IgD^- (naranja) e IgM-IgD^- (azul) conmutadas de b, c. Anticuerpos anti-pico IgM (**d**) e IgG (**e**) en suero nueve días tras la inmunización. **f**. Gráficos circulares que muestran la proporción de IgG anti-pico de las subclases indicadas en el suero nueve días tras la inmunización. Porcentaje (**g**) y número (**h**) de células B del centro germinal en el ganglio linfático aórtico. **i**. Gráficos circulares que muestran la proporción de células del centro germinal IgM^+ IgD^- (naranja) e IgM-IgD^- (azul) conmutadas de g, h. Número de células T auxiliares foliculares (**j**) y T foliculares reguladoras (**k**) en el ganglio linfático de drenaje. Imágenes confocales del bazo de ratones inmunizados con ChAdOx1 nCoV-19 de las edades indicadas, en (**l**) las barras de escala representan 500 µm en (**m**) las barras de escala representan 50 µm. Folículo de células B IgD^+ en verde, células T $CD3^+$ en magenta, células $Ki67^+$ en

azul y células dendríticas foliculares $CD35^+$ en blanco. Porcentaje (**n**) y número (**o**) de células B del centro germinal esplénico. **p**. Porcentaje de células B $Ki67^+$ en el bazo. Número de células auxiliares foliculares T esplénicas (**q**) y células reguladoras foliculares T (**r**). Anticuerpos anti-pico IgM (**e**) e IgG (**f**) séricos y subclases de IgG (**u**) 28 días tras la inmunización. La altura de la barra corresponde a la mediana y cada círculo representa una réplica biológica. Se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos son consistentes con una distribución normal, seguida de o bien una prueba ANOVA ordinaria unidireccional para datos con una distribución normal o bien una prueba de Kruskal Wallis para datos no distribuidos normalmente junto con una prueba de comparaciones múltiple. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (n = 4-8 por grupo/experimento).

La **Figura 50** muestra una inmunización de refuerzo que mejora la respuesta de las células B a la inmunización de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones envejecidos. **a**. Esquema del protocolo de inmunización sensibilización-refuerzo. **b**. Porcentaje de células B $Ki67^+$ en el ganglio linfático de drenaje. Porcentaje (**c**) y número (**d**) de células plasmáticas en el ganglio linfático aórtico. **e**. Gráficos circulares que muestran la proporción de células plasmáticas IgM^+ IgD^- (naranja) e IgM^-IgD^- (azul) conmutadas de b, c. Porcentaje (**f**) y número (**g**) de células B del centro germinal en el ganglio linfático aórtico. **h**. Gráficos circulares que muestran la proporción de células del centro germinal IgM^+ IgD^- (naranja) e IgM^-IgD^- (azul) conmutadas de g, h. Número de células T auxiliares foliculares (^{i}) y T foliculares

reguladoras (**j**) en el ganglio linfático de drenaje. Porcentaje (**k**) de células B del centro germinal esplénico. Subclases séricas de IgM (**l**), IgG (**m**) e IgG anti-pico (**n**, **o**) antes del refuerzo (día 29) y nueve días tras la inmunización de refuerzo. Los títulos de anticuerpos neutralizantes de **p-q** SARS-CoV-2 en sueros se determinaron mediante una prueba de micro neutralización, expresada como dilución de suero recíproca para inhibir la entrada de pseudovirus en el 50% (CI_{50}). Las muestras por debajo del límite inferior de detección (LLoD) se muestran como la mitad del LLoD. La altura de la barra corresponde a la mediana y cada círculo representa una réplica biológica. Se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los datos son consistentes con una distribución normal, seguida de o bien una prueba ANOVA ordinaria unidireccional para datos con una distribución normal o bien una prueba de Kruskal Wallis para datos no distribuidos normalmente junto con una prueba de comparaciones múltiple. En b-o, se muestran a partir de uno de dos experimentos independientes (n = 4-8 por grupo/experimento), en p y q los datos se agrupan a partir de dos experimentos.

La Figura 51 muestra gráficos de barras.

La Figura 52 muestra gráficos de barras.

La Figura 53 muestra gráficos de barras.

La Figura 54 muestra gráficos de barras.

La Figura 55 muestra diagramas de Kaplan-Meier.

EJEMPLOS

Resumen/ Criterio de valoración del desarrollo de vacunas

- Se genera la vacuna ChAdOx1 SARS-CoV2 para estudios preclínicos

- Las pruebas preclínicas incluyen estudios de inmunogenicidad iniciales en ratones seguidos de estudios de eficacia en hurones y NHP
- Se genera una disolución madre de semilla de vacuna adecuada para la fabricación de cGMP
- Se fabrica un lote de fase I/II de 1000 dosis de vacuna para cGMP y se pone a disposición para ensayos clínicos
- Se obtiene la aprobación ética y reglamentaria para un ensayo en el RU
- Se realiza un estudio de Fase I/II, proporcionando datos de seguridad e inmunogenicidad en adultos, adultos mayores y niños.
- Se inicia la fabricación a gran escala de la vacuna (200 L, aproximadamente 20,000 dosis por lote)

Planteamiento general

En estos ejemplos los inventores:

1. Demuestran la eficacia de la vacuna ChAdOx1 nCoV en modelos de exposición con hurón y primates no humanos
2. Producen 1000 dosis de ChAdOx1 SARS-CoV2 listas para su uso en estudios clínicos
3. Realizan un ensayo clínico de ChAdOx1 SARS-CoV2 en adultos de 18 a 50 años, lpara luego pasar a adultos mayores de 50 años y niños en edad escolar
4. Caracterizan la respuesta inmune frente a proteína de pico del SARS-CoV2 en voluntarios de ensayos clínicos

Esta vacuna frente al SARS-CoV2 se usa para demostrar el desarrollo clínico y los estudios de eficacia preclínica. Se están desarrollando otras tecnologías de vacunas, tales como las vacunas de proteína recombinante, ADN y ARN, pero requieren múltiples dosis para lograr respuestas inmunes

que pueden medirse frente al antígeno de la vacuna. Basándose en datos preclínicos preexistentes, los inventores afirman que las vacunas de la invención, de manera más adecuada ChAdOx1-nCoV tal como se describe en el presente documento, pueden inducir inmunidad protectora después de una dosis única y dentro de los 14 días posteriores a la (de manera adecuada la primera y única) vacunación.

Ejemplo 1:

Para ChAdOx1 SARS-CoV2, se lleva a cabo la preparación de disolución madre de semilla de vacuna.

Se inicia el desarrollo de un método de generación de existencias de semillas de vacunas rápida, con el objetivo de una respuesta rápida en una situación de brote. En situaciones de emergencia, el trabajo se acelera para permitir la producción rápida de disolución madre de semillas de la vacuna ChAdOx1 SARS-CoV2 en paralelo con material de grado de investigación para pruebas preclínicas. Un componente importante del "método rápido" es la adopción de protocolos de prueba de liberación rápida de vacunas para reducir el tiempo de prueba de liberación de vacunas de 5 meses a 1 mes. Los planes generales ya han recibido una revisión positiva de la MHRA.

Se llevan a cabo más conversaciones con la MHRA sobre la especificación del producto que va a emplearse para ChAdOx1 SARS-CoV2.

De manera adecuada, la aprobación ética y regulatoria rápida para los ensayos en el RU puede organizarse en el plazo de los días de la presentación de la Autorización de Ensayos Clínicos (CTA).

Luego, la fabricación se transfiere a los fabricantes de GMP.

De manera adecuada, un fabricante (Advent) produce material (inicialmente 1000 dosis) para un estudio de fase I/II en el RU, sometiendo a prueba la vacuna en adultos, y luego progresando a adultos mayores y niños, usando una dosis única a un nivel determinado por los estudios de vacuna ChAd anterior.

De manera adecuada, un fabricante (CanSino) fabrica en China, a escala de 200 L, 20,000 dosis por lote. Se llevarán a cabo estudios adicionales para determinar la eficacia de la vacuna y permitir la autorización de la vacuna según la necesidad clínica, por ejemplo, el desarrollo de acontecimiento(s) epidémico(s). Si es necesario, puede optimizarse aún más la producción y ampliar la capacidad, tanto para aumentar el rendimiento por lote como el número de lotes que se pueden producir simultáneamente. Ya están disponibles líneas de llenado de alta capacidad, con o sin liofilización.

Se llevan a cabo estudios preclínicos para someter a prueba la inmunogenicidad y la eficacia de la vacuna en un modelo de primates no humanos. De manera adecuada, esto se realiza a NIH.

De manera adecuada, se lleva a cabo un trabajo adicional sobre correlatos de protección en este modelo.

Ejemplo 2:

Los inventores producen una vacuna vectorizada por ChAdOx1 frente a nCoV-2019.

Los inventores enseñan la fabricación GMP completa de un primer lote para estudios clínicos.

Los estudios de eficacia animal se realizan por dos organizaciones, NIH y CSIRO, para demostrar la eficacia de la vacuna después de una dosis única en primates y hurones no humanos.

Los hurones (o en un experimento individual, primates no humanos) se vacunan con o bien una dosis de ChAdOx1 nCV-19 o bien dos dosis administradas en intervalos de 4 semanas. Los animales de control se vacunarán con dos dosis o con dos dosis de una vacuna de control, ChAdOx1 que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). 4 semanas después de la vacunación final, se exponen los animales al virus del SARS-CoV2 vivo a través de la vía respiratoria.

Los animales serán monitoreados para detectar signos clínicos, y se tomarán muestras de la vía respiratoria diariamente para determinar la extensión del virus, es importante tener en cuenta que estos análisis se realizaron a los días o bien 9 o bien 10 tras la vacunación, mientras que lo habitual sería analizar las respuestas de las células T a los 14 días y los anticuerpos a los 28 días. Estas son respuestas excepcionalmente fuertes para un punto de tiempo de ensayo tan temprano. Esto es de particular importancia para que se use una vacuna frente a un patógeno de brote para el que será altamente beneficioso el inicio rápido de la inmunidad.

Los inventores dan a conocer un ensayo clínico de fase I/II con un diseño adaptativo que permite añadir más grupos tras la demostración de seguridad e inmunogenicidad en el primer componente humano del estudio. Paralelamente, se proporciona una disolución madre de semillas de vacunas a un fabricante con capacidad de fabricación a gran escala y un historial probado en la fabricación de adenovectores

para cGMP, con el fin de permitir el suministro de un gran número de dosis para pruebas de eficacia y despliegue.
El ensayo de fase I/II descrito en el presente documento puede realizarse en el RU. Esto proporciona datos de seguridad e inmunogenicidad en adultos, adultos mayores (que tienen mayor riesgo de morbimortalidad) y niños (que pueden ser responsables de gran parte de la transmisión de cualquier patógeno respiratorio).
Las próximas fases del desarrollo clínico dependen del progreso de un brote en particular, y los datos generados permiten realizar más estudios.

Ejemplo 3

El orden de los eventos para los estudios preclínicos es primero demostrar la inmunogenicidad en ratones (anticuerpos y respuestas de células T) y luego proceder con las pruebas de eficacia de la vacuna en primates no humanos (en colaboración con NIH) y las pruebas de eficacia de la vacuna en hurones (en colaboración con CSIRO). CEPI ya está financiando a CSIRO para establecer el modelo de hurón para 2019-nCoV (PI: Prof.S.S.Vasan).
Los inventores enseñan que la vacuna es protectora después de una dosis única, y los datos que lo demuestran se generan como anteriormente.
Está en marcha un estudio de eficacia con 6-8 hurones en paralelo al estudio de progresión natural (fecha de exposición prevista el 23 de marzo).
Se ha establecido un rango de dosis clínica en otros estudios. En el componente *First in Human* de los estudios clínicos, se han sometido a prueba inicialmente dos dosis diferentes. Dada la experiencia clínica con las vacunas con vector de ChAdOx1, es posible que no se requiera un estudio

de toxicología para el estudio del RU. Sin embargo, se lleva a cabo un estudio de toxicología como se ha hecho para otras vacunas con vector de ChAdOx1 (realizado incluso si no es necesario), ya que los datos se consideran valiosos para iniciar estudios en otros países.

El ensayo de potencia se establece bien y es una medida de la concentración de la vacuna en lugar de requerir estudios de inmunología. A continuación se muestra un protocolo para determinar la infectividad de adenovirus que es útil como ensayo de potencia para vacunas adenovectorizadas:

1.0 Número de protocolo de laboratorio Jenner J259

2.0 Versión Número 9

3.0 Inmunoensayo de título de adenovirus

4.0 Observaciones:

Este método se diferencia de la versión anterior en que mide 4 virus por triplicado en cada placa. Cada placa requiere la preparación única de los cuatro virus usando una multipipeta de 12 canales.

Este ensayo es muy susceptible a la pérdida de células de las monocapas durante el protocolo de inmunotinción. También parece ser sensible al efecto de borde tanto durante el cultivo celular como durante la tinción. Específicamente:

Las células HEK293 solo se adhieren débilmente. Se han usado placas revestidas para tratar de superar esto, pero las monocapas todavía son relativamente frágiles.

Tenga cuidado con el pipeteo durante todo el protocolo (cultivo celular y tinción)

Efecto de borde durante el cultivo celular

La evaporación de los pocillos del borde y particularmente de los pocillos de las esquinas puede

afectar negativamente la salud celular en estos pocillos (véase la nota en el apéndice).

Si el volumen es demasiado bajo, el menisco que se forma puede concentrar las llamadas no adheridas a los bordes y dejar esas células en el centro de los pocillos con un medio insuficiente que las cubra.

Se usa las cajas cuadradas Nunc con papel secante húmedo para proporcionar una atmósfera de alta humedad constante. Las placas colocadas cerca de la puerta de la incubadora y/o retiradas con frecuencia para observación estarán sujetas a disminución de humedad y una mayor evaporación.

Efecto de borde durante la tinción.

Cuando las placas se transfieren entre diferentes temperaturas, los bordes alterarán la temperatura mucho más rápidamente que los pocillos centrales. Es importante permitir que toda la placa alcance la misma temperatura en cada etapa.

Evite apilar placas ya que las del centro estarán a temperaturas muy diferentes a las de las placas exteriores.

Asegúrese de que los tiempos de incubación sean lo suficientemente largos para llevar la placa a una temperatura uniforme.

Otros documentos

MSDS se refiere a la MSDS para obtener la información de seguridad relevante sobre los reactivos individuales: \\Imsnw3_jenner_server\jenner\hill_group\Safety\COSHH assessments\Manufacturers material safety data sheets

R002 Adenovirus
\\Imsnw3_jenner_server\jenner\hill_group\Safety\GMO RA\R002 adenovirus.doc

R004 Apéndice de OMG RA

C030 Cultivo de células primarias y líneas celulares incluyendo congelación y reactivación

C024 Uso de penicilina para cultivo de tejidos en individuos sensibilizados

C066 Uso de antibióticos para la selección de células

J011 Haciendo pasar 293 células

Deben usarse anteojos o gafas de seguridad al lavar placas de 96 pocillos durante el procedimiento de tinción. Existe el riesgo de que se produzcan salpicaduras en los ojos al arrojar el líquido de las placas al medio de disolución.

5.0 Definiciones

FCS Suero fetal de ternera

DMEM Medios de Eagle modificados de Dulbecco

PBS Suero salino tamponado con fosfato

TBS Solución salina tamponada con Tris

RT Temperatura ambiente

6.0 Objetivo

Calcular el título viral infeccioso visualizando células infecciosas inmunoteñidas.

7.0 Reactivos

DMEM Sigma D6546

DMEM Lonza/ SLS LZBE12-604F

Pen/Estrep Sigma

Glutamina Sigma

FCS Sigma F2442

Tinte azul tripán Sigma T8154

TrypLE Express Invitrogen I2605

Placa de 96 pocillos negro / transparente BD purecoat amine VWR 734-1476

Metanol Sigma 32213

Comprimidos de PBS Sigma P4410-100TAB

Polvo de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (10 L) Invitrogen 21600-069

Bloxall Vector labs SP-6000

Anticuerpo primario 1000x (1 mg/ml) 500 µl AbCam ab7428

(£235/500 placas) – 47p por placa

10000x IgG anti-ratón (molécula completa)-Alcalina Anticuerpo de fosfatasa producido en cabra Sigma A3562

(£63/500 placas) – 13p por placa

TBS Sigma T5912-1L

Disolución BCIP/NBT(Plus) Europa Bioproducts Ltd MO711A-1000

Disolución preparada de caseína al 1% ThermoScientific 37528

(£94/litro) -

Equipo

Cabina de bioseguridad de clase II Scanlaf Mars

Incubadora de CO_2 RS Biotech Galaxy R

Baño de agua a 37°C Grant SUB6

Microscopio Leica DMIL

Hemocitómetro Neubauer

Placa de 96 pocillos negro/transparente bd purecoat amine VWR 734-1476

(£5.60 por placa)

Placa de cultivo tisular con fondo en V de 96 pocillos Greiner Bio-one 651201

Aspirador

Vórtex

2 pipetas multicanal p200 de 8 pocillos

Pipeta p1000

Pipeta p10

Caja cuadrada Nunc

Papel de filtro ThermoScientific 86620

8.0 Método

Preparación de reactivos:

FCS DMEM al 10% completo +Blasticidina

500 ml de DMEM

50 ml de FCS (conc final al 10%)

5 ml Pen/Estrep (100 U Penicilina, conc final de 0.1 mg de estrep ml^{-1})

10 ml de L-glutamina (conc final de 4 mM)

250 µl de Blasticidina (conc final de 5ug/ml)

Las placas de 96 pocillos del día 0 deben sembrarse a partir de células TREX tomadas de un matraz T175 cultivadas hasta una confluencia del 50%-60%.

Día 1

9.1 Células en placa: los virus generalmente se titulan en células HEK293-TRex independientemente de la línea celular usada para la producción. Preparar suficientes placas para cada solicitud en las densidades que se muestran a continuación.

9.1.1. Las células deben contarse con un hemocitómetro de vidrio.

9.1.2. Calentar previamente Caja Nunc que contiene papel secante humedecido con agua/Sigmaclean y placas.

9.1.3. 100 µl de células sembradas por pocillo – (5 x 10^6 células en 12 ml por placa).

9.1.4. Colocar las placas en la caja cuadrada Nunc con un poco de papel secante húmedo debajo para proporcionar un ambiente de alta humedad constante.

9.1.5. Incubar placas durante la noche en 37°C, incubadora de CO_2 al 5%

9.1.6. Retirar una alícuota de DMEM al 10% (10 mL por virus más 10 mL para el control) para equilibrar a temperatura ambiente durante la noche.

Día 2

Antes de comenzar cualquier trabajo, verificar que las células en la placa de 96 pocillos sean el 100% confluentes. Deben ser el 100% confluentes para capturar todas las partículas virales en la muestra. Las placas pueden dejarse hasta la tarde pero no se debe dejar un día adicional.

9.2 Preparación de dilución en serie de virus.

9.2.1. Calentar previamente la caja Nunc que contiene papel secante humedecido en el laboratorio de virus.

9.2.2. Retirar una alícuota de 10 µl de virus purificado del congelador a -80°C y descongelar a temperatura ambiente.

9.2.3. Rellenar hasta 100 ul con 90ul de D10 + Blasticidina.

9.2.4. Envolver la tapa de cada alícuota de virus con parafilm.

9.2.5. Sonicar cada alícuota durante 30 segundos al 50% de potencia.

9.2.6. Asegurarse de que se usa una buena técnica de pipeteo tal como se describe en J212 para asegurarse de que se obtienen datos de la mejor calidad posible.

9.2.7. Transferir 20 ml de medio (FBS al 10%, DMEM + blasticidina) al depósito de reactivo.

9.2.8. Sacudir las alícuotas de virus para resuspender completamente el virus y luego forzar el material a la base del tubo con una sacudida grande.

9.2.9. Para este método, preparará las diluciones usando dos placas de fondo en V, orientadas con los 12 pocillos verticalmente.

9.2.10. Tomar 20 µl de muestra del tubo de la disolución madre y añadir a la primera columna de una 96 placa de fondo en V.

9.2.11. Repetir las etapas 9.2.7 y 9.2.8 para que los virus restantes se añadan a la placa.

9.2.12. Usando una pipeta multicanal, añadir 180 µl de medio a los pocillos.

9.2.13. Usando nuevas puntas en el multicanal p200; triturar las muestras diez veces lentamente para evitar la formación de espuma.

9.2.14. Usar una pipeta multicanal para transferir 20 µl de la primera dilución a la segunda columna de pocillos.

9.2.15. Continuar preparando las series de dilución tal como se muestra en la tabla a continuación. Observar que los volúmenes para añadir cambian a la mitad de la tabla.

	Disolución madre del virus	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	3.3×10^{-7}	1.1×10^{-7}	3.7×10^{-8}	1.2×10^{-8}	4.1×10^{-9}
Virus (µl)	Disolución madre	20	20	20	20	20	75	75	75	75	75
DMEM al 10% (µl)	-	180	180	180	180	180	150	150	150	150	150
		Placa 1					Placa 2				

9.3 Preparación de dilución en serie de virus control

9.3.1. Retirar una alícuota de 10 µl de virus de control del congelador a -80°C y descongelar a temperatura ambiente.

9.3.2. Asegurarse de que se usa una buena técnica de pipeteo tal como se describe en J212 para asegurarse de que se obtienen datos de la mejor calidad posible.

9.3.3. Sacudir las alícuotas de virus para resuspender completamente el virus y luego forzar el material a la base del tubo con una sacudida grande.

9.3.4. Preparar 4 crioviales, eiquetados -2, -4, -6, -8

9.3.5. Tomar 5 µl de muestra del tubo de la disolución madre y añadir al primer criovial de 2 mL.

9.3.6. Añadir 495 µl de medio al criovial.

9.3.7. Usando punta nueva, triturar las muestras diez veces lentamente para evitar la formación de espuma.

9.3.8. Transferir 5 µl de la primera dilución en un segundo criovial.

9.3.9. Continuar preparando las series de dilución tal como se muestra en la tabla a continuación.

	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}
Virus (µl)	5	5	5	5
DMEM al 10% (µl)	495	495	495	495

9.4 Infección de células con dilución en serie de virus

9.4.1 Usando la pipeta de aspiración multicanal, aspirar el medio de la mitad de una placa de 96 pocillos preparada el día anterior; tener cuidado de no dañar la monocapa celular con las puntas de la pipeta. Deberá tocar las bases de los pocillos, pero solo hay que tener mucho cuidado.

9.4.2 Con cuidado, para no dañar la capa celular, añadir 50 µl de cada una de las diluciones anteriores (en fuente roja) por pocillo a la pared lateral del pocillo.

9.4.3 Añadir 50 µl de medios a los pocillos de control negativo.

9.4.4 Colocar las placas en la bandeja cuadrada Nunc con papel secante húmedo en la base para proporcionar un ambiente de alta humedad constante.

9.4.5 Incubar placas durante 24 horas a 37°C, CO_2 al 5%.

Día 3

9.5 Adición de medios a pocillos para garantizar la salud celular, el trabajo debe comenzar exactamente 24 horas después de la infección con el virus.

9.5.1 Calentar previamente los medios hasta 37°C.

9.5.2 Usando una pipeta multicanal, añadir 50 µl de DMEM al 10% + blasticidina a cada pocillo de las placas

9.5.3 Incubar placas durante la noche en 37°C, incubadora de CO_2 al 5%

9.5.4 Colocar metanol en el congelador a -20°C para su uso en el día 4

Día 4

9.4 Fijar células, el trabajo debe comenzar exactamente 48 horas después de la infección con el virus.

9.4.1. Comprobar los pocillos de control positivo para la expresión de GFP y contar los pocillos usando el microscopio de fluorescencia.

9.4.2. Usando un aspirador multicanal, aspirar el medio de una placa de 96 pocillos, una placa a la vez.

9.4.3. Tener cuidado de no dañar la monocapa celular con la pipeta.

9.4.4. Muy suavemente, usando una pipeta multicanal, añadir 100 µl de metanol enfriado previamente a todos los pocillos.

9.4.5. Incubar placas a -20°C en el laboratorio de virus durante un mínimo de 20 minutos.

NOTA: El protocolo puede detenerse y las placas se almacenan a -20°C hasta que se requieran.

9.5 Inmunotinción: usar anteojos/gafas de seguridad para las etapas de lavado

9.5.1. Retirar las placas de -20°C e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos (no apilar).

9.5.2. Preparar solución salina tamponada con Tris 1x en un frasco de Duran de 1 litro diluyendo 100 ml de la disolución 10x en 1 litro con 15 MΩ de agua.

9.5.3. Preparar Marvel al 3% en TBS: Pesar 1.2 g de Marvel en un tubo Falcon de 50 ml, completar hasta 40 ml con **TBS** y dejar a TA.

9.5.4. Lavar las placas 4 veces con RT D-PBS (placas inmersas en D-PBS en una caja de sándwich y sacudir en el medio de disolución, inmutransferir en *blue roll*. Lavar y sacudir 3 veces más. Finalmente inmunotransferir en *blue roll* para garantizar que se elimina todo PBS).

9.5.5. Pipetear 12 ml de bloxall del frasco en un depósito de reactivo. Añadir 100 µl de reactivo a cada pocillo usando el repetidor multicanal. Bloquear durante 30 minutos a TA* – no apilar las placas.

9.5.6. Eliminar Bloxall sacudiendo en medio de disolución.

9.5.7. Lavar las placas 4 veces con RT D-PBS (placas inmersas en D-PBS en una caja de sándwich y sacudir en el medio de disolución, inmutransferir en *blue roll*. Lavar y sacudir 3 veces más. Finalmente inmunotransferir en *blue roll* para garantizar que se elimina todo PBS).

9.5.8. Pipetear 25 ml de disolución de caseína en PBS a un depósito de reactivo. Añadir 200 µl o reactivo a cada pocillo y bloquear durante 15 min. a TA.

9.5.9. Diluir anticuerpo primario 1:1000 en solución de caseína al 1% (12 µl en 12 ml por placa).

9.5.10. Retirar la caseína sacudiendo en el medio de disolución (no hay necesidad de lavar en esta etapa) seque en un *blue roll* para asegurarse de que toda la disolución de caseína se elimine de los pocillos (cualquier caseína residual diluirá el anticuerpo primario añadido en la siguiente etapa).

9.5.11. Añadir 100 µl de disolución de anticuerpo anti-Hexon 1x a cada pocillo usando la pipeta multidispensadora BIOHIT e1200 y puntas con filtro BIOHIT.

9.5.12. Incubar durante 30 min–1 hora a temperatura ambiente – no apilar las placas.

9.5.13. Retirar BCIP/NBT (12 ml por placa) en un tubo de 50 ml. Filtrar en un tubo nuevo de 50 ml usando una jeringa de 50 ml y filtro de 0.45 µm y dejar calentar hasta temperatura ambiente (proteger de la luz con papel de aluminio)

9.5.14. Diluir el anticuerpo secundario 1:1000 en Marvel al 3% en TBS (12 µl en 12 ml por placa).

9.5.15. Lavar las placas 4 veces con RT D-PBS (placas inmersas en TBS en una caja de sándwich y sacudir en el medio de disolución, inmutransferir en *blue roll*. Lavar y sacudir 3 veces más. Finalmente inmunotransferir en *blue roll* para garantizar que se elimina todo PBS).

9.5.16. Añadir 100 µl de disolución de anticuerpo secundario 1x (conjugado con AP anti-ratón) a cada pocillo usando la pipeta multidispensadora BIOHIT e1200 y las puntas con filtro BIOHIT.

9.5.17. Incubar durante 30 min–1 hora a temperatura ambiente – no apilar las placas.

9.5.18. Lavar las placas 4 veces con RT D-PBS (placas inmersas en TBS en una caja de sándwich y sacudir en el medio de disolución, inmutransferir en *blue roll*. Lavar y sacudir 3 veces más. Finalmente inmunotransferir en *blue roll* para garantizar que se elimina todo PBS).

9.5.19. Añadir 100 µl de disolución de BCIP/NBT a cada pocillo usando la pipeta multidispensadora BIOHIT e1200 y puntas con filtro BIOHIT.

9.5.20. Incubar durante al menos 10 minutos o hasta que empiecen a aparecer puntos índigo.

9.5.21. Retirar BCIP/NBT sacudiendo en el medio de disolución y lavar la placa cinco veces con agua del grifo, después del último lavado, golpee la placa repetidamente sobre el *blue roll* para eliminar la mayor cantidad de agua posible.

9.5.22. Retirar las tapas de las placas y colocarlas boca abajo sobre un trozo de *blue roll* protegido de la luz y dejar secar durante la noche antes del recuento.

***Bloxall se suministra en un frasco gotero hermético a la luz. Retirar la tapa del gotero antes del primer uso para permitir que el pipeteado y se transfiera a un depósito de reactivo.**

Recuento

9.6.1 Usando el lector AID Elispot:

a. Cortar un trozo de papel blanco o cartulina para que quepa debajo del plato. Colocar esto en el lector Elispot y colocar la placa encima.

b. Encender el lector Elispot e iniciar sesión en el ordenador con las credenciales de inicio de sesión estándar de Novell.

c. Colocar la placa en el soporte. Tradicionalmente se ha colocado la serie de diluciones 1 a la izquierda.

d. Buscar el programa "Eli" en la carpeta C:/Elispot4.osr. Crear un acceso directo en el escritorio para uso futuro. Iniciar sesión y abrir el programa:

La computadora muestra un mensaje de error: el archivo de diseño "no existe". Presionar OK

Nombre de usuario = vector

Contraseña = vector

e. Nuevo archivo, hacer clic en Aceptar. Herramientas> Configuración de recuento> Amina VVCF> Aceptar.
f. Hacer clic en el icono para abrir un nuevo documento
g. Herramientas> Fase> Cargar calibración.
h. Seleccionar placa adeno negra
i. Herramientas> Fase > Calibrar Fase
Cuando se abra una ventana, hacer clic en el botón "A1" debajo del encabezado "Calibrar estos pocillos". Usando las flechas a la derecha de la pantalla, ajustar la posición y el tamaño del círculo para que encaje justo dentro de A1. Repetir para los pocillos A12 y H12, y presionar Aceptar.
j. Presionar el icono "Ir" para leer y contar la placa. Hacer clic en una de las imágenes del pocillo para verla. Si las imágenes no son claras, ajustar la configuración de la cámara mediante Herramientas> Configuración de la cámara. Si es difícil enfocar con la cámara, verificar que las placas estén secas.
Si el lector está marcando partes del pocillo que no contienen un punto marrón:
Herramientas> Configuración de recuento> Ad Immuno> editar. Aumentar el umbral de intensidad y volver a contar la placa.
NOTA: Es mejor omitir algunos puntos que contar puntos adicionales, ya que es fácil añadir puntos más tarde.
k. Abrir cada imagen de forma secuencial y añadir los puntos que el lector haya pasado por alto haciendo clic en el icono "Añadir puntos" (objetivo) y luego hacer clic en las células marrones. Solo editar pocillos con 50 - 200 puntos. Observar qué serie de dilución se recuenta en cada caso.

NOTA: Los pocillos deben estar el 100% intactos para ser contados. Se debe contar un mínimo de 3 pocillos por virus por titulación. Si hay menos de esto disponible, la titulación debe repetirse.

l. Al terminar, hacer clic en Guardar como: S:/Vector Core Facility/Image Files/Titration Images. Esto creará una carpeta que contiene las imágenes del pocillo, junto con un documento de bloc de notas que muestra los recuentos finales.

m. Al terminar, hacer clic en el icono "Expulsar" para quitar la placa.

9.6.2 Ingresar los recuentos en la pestaña "Recuentos inmune" de la Tabla de producción de adenovirus en S:/Virus Production Records. La hoja de cálculo debe calcular el título automáticamente, usando la fórmula:

"número promedio de puntos" x *"dilución en serie"* x *"factor de dilución"* = *"x"* iu/ml

Por ejemplo, si se obtienen recuentos de 36 y 40 en la dilución 10^{-7}:

$\underline{(36+40)} = 38 \times (1\times10^{7}) \times 20 = 7.6 \times 10^{9}$ iu/ml

NOTA: Verificar que la célula "Promedio por pocillo" está seleccionando los valores apropiados en su fórmula.

9.6.3 Ingresar el título en la pestaña correspondiente de la hoja de cálculo (O bien 'Mantenimiento de existencias' o bien 'Nuevos adenovirus'). Calcular la relación P con respecto a I dividiendo las partículas virales por ml (de la lectura de especificaciones) por las UI/ml de la titulación.

P: Los valores de I superiores a 100 normalmente se consideraran demasiado altos para los virus AdCh63, mientras que los valores superiores a 50 normalmente son

demasiado altos para los virus AdHu5. En este caso, considerar repetir el procedimiento de purificación e infección del hiperfrasco.

Apéndice:

Método de fijación de células (Feb de 2013).

Se ha demostrado que la fijación con metanol (-20°C) deshidrata las células TREX de manera muy agresiva (observamos que se deja caer metanol en las células en una placa de 6 pocillos no recubierta de amina y se encogen y se desprenden de la superficie plástica). La fijación de metanol debe realizarse a -20°C ya que esto ralentiza la eliminación de lípidos y reduce la destrucción celular, por esta razón, el metanol también debe eliminarse antes de calentar la placa antes de teñir.

Se ha analizado la fijación con formaldehído al 4%, que es mucho más suave para las células, pero esto dio como resultado que la tinción sea muy difusa alrededor de cada célula teñida.

Durante el cultivo, el agua y el medio comúnmente se evaporan de los pocillos más cercanos al perímetro de la placa, siendo los más afectados los pocillos 36 externos y de las esquinas. El resultado es una variación en el crecimiento celular a través de la placa, mientras que cualquier componente del medio, tal como la sal, puede concentrarse hasta el punto de que sea dañino para las células. Una pérdida de volumen tan pequeña como el 10% puede concentrar los componentes de los medios y los metabolitos lo suficiente como para alterar la fisiología celular, lo que repercute en la viabilidad de los datos posteriores, provocando resultados heterogéneos o sesgados.

Si las células no son saludables en los pocillos externos, es más probable que se pierdan de la placa durante el lavado.

Puntos que se han considerado durante el desarrollo del método:

Alimentando células después de 24 h

Se ha intentado omitir esta etapa, cuando se colocan las placas en las placas cuadradas Nunc, no se produce evaporación y, por tanto, las células parecen estar disgregadas en 50 µl durante 48 h.

Efecto de borde

Se ha demostrado que el efecto de borde no ocurre cuando se usan las bandejas cuadradas Nunc para incubar las placas en todas las fases de tc. No se ha probado que sea un problema sin las placas.

Para someter a prueba, se ha titulado el virus de control en todos los pocillos a la misma concentración. Se contaron los puntos usando el lector EliSpot. Se calcularon la media y el IC del 95% y no hubo pocillos fuera de este rango.

Número de puntos contados.

Para que los recuentos sean significativos cuando se utiliza la distribución de Poisson, es necesario contar un cierto número de eventos. En el caso de una titulación como esta, hay que estar seguros de que hay recuentos suficientes, pero también de que no se están presenciando acontecimientos de doble infección (una sola célula infectada con más de una partícula de virus).

Con este fin: si se ha asumido un límite superior de 200 puntos en un pocillo que contiene aproximadamente 20000 células, MOI 0.01)

Función POISSON (de Excel)

Devuelve la distribución de Poisson. Una aplicación común de la distribución de Poisson es predecir el número de eventos en un volumen específico, por ejemplo, el número de partículas virales por ml.

N.° de serie de diluciones

Número máximo de puntos que se pueden contar antes de que se hayan visto células infectadas con más de una partícula de virus

TCID50 y ufp/ml

Suponiendo que se usa el mismo sistema celular, que el virus forma placas en esas células y que no se añaden procedimientos que inhiban la formación de placa, se esperaría que 1 ml de la disolución madre de virus tenga aproximadamente la mitad del número de unidades formadoras de placa (UFP) como TCID50. Esto es solo una estimación, pero se basa en el razonamiento de que la dilución limitativa que infectaría al 50% de las capas de células expuestas a menudo se esperaría que inicialmente produjera una sola placa en las capas de células que se infectan. En algunos casos, dos o más placas pueden formarse al azar y, por tanto, el número real de UFP debe determinarse experimentalmente.

Matemáticamente, las UFP esperadas serían algo mayores que la mitad del TCID50, ya que los tubos negativos en el TCID50 representan cero unidades formadoras de placa y los tubos positivos representan cada uno una o más unidades formadoras de placas. Se obtiene una estimación más precisa aplicando la distribución de Poisson. Donde P(o) es la proporción de tubos negativos y m es el número medio de unidades infecciosas por volumen (UFP/ml), P(o) = e (-m).

Para cualquier título expresado como TCID50, P (o) = 0.5.
Por tanto, e(-m) = 0.5 y m = -ln 0.5 que es ~ 0.7.
Por tanto, se podría multiplicar el título de TCID50 (por ml) por 0.7 para predecir el número medio de UFP/ml. Cuando se apliquen estos cálculos, hay que recordar que la media calculada solo será válida si los cambios en el protocolo necesarios para visualizar las placas no alteran la expresión del virus infeccioso en comparación con la expresión en las condiciones empleadas para TCID50.
Por tanto, como estimación de trabajo, puede suponerse que un material con un TCID50 de 1x 10^5 TCID50/ ml producirá 0.7 x 105 UFP/ml.

Ejemplo 4

En primer lugar, se lleva a cabo un ensayo clínico de estudio de fase I/II que incorpora un primer estudio en humanos en adultos sanos de entre 18-50 años que se realiza primero.
En segundo lugar, se lleva a cabo un componente de fase II que somete a prueba la vacuna en adultos mayores y niños tras la revisión de los datos de seguridad en los primeros grupos por parte de un comité de seguridad local.
El protocolo se resume a continuación, y el proceso de enmienda de CTA permite la adición de más grupos, aumentando el tamaño de los grupos, o agregando más sitios de ensayos clínicos en el RU según sea necesario dependiendo de la propagación de las infecciones de nCoV en todo el mundo.

Grupos de administración intramuscular

Los grupos 1 y 2 constituyen el componente "First in Human". Se vacunan al menos 5 sujetos por grupo antes de pasar a otros grupos.

Grupo	Grupo de edad	Dosis	Programación
Grupo 1 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	$2.5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 2 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	$5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 3 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	$2.5x10^{10}$ vp	Dos dosis 4 semanas de diferencia
Grupo 4 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	$5x10^{10}$ vp	Dos dosis 4 semanas de diferencia
Grupo 5 (n=10)	Adultos mayores de 51-65 años	$5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 6 (n=10)	Adultos mayores de >65 años	$5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 7 (n=10)	Niños de 12-15 años	$2.5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 8 (n=10)	Niños de 12-15 años	$5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 9 (n=10)	Niños de 5-11 años	$2.5x10^{10}$ vp	Dosis única
Grupo 10 (n=10)	Niños de 5-11 años	$5x10^{10}$ vp	Dosis única

Grupo 11 (n=10)	Niños de edad de 6 meses a 4 años	$1x10^{10}$ vp	Dosis única

Brazos de aerosol - seguimiento con broncoscopia

Grupo	Grupo de edad	Aerosol Dosis	Dosis IM
Grupo 12 (n=3)	Adultos sanos de 18-50 años	$1x10^{9}$ vp	NA
Grupo 13 (n=3)	Adultos sanos de 18-50 años	$1x10^{10}$ vp	NA
Grupo 14 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	$1x10^{10}$ vp	Placebo salino
Grupo 15 (n=10)	Adultos sanos de 18-50 años	Placebo salino	$5x10^{10}$

De manera adecuada, la inmunología puede evaluarse al inicio, 7, 28, y opcionalmente 182 días. El protocolo se da a conocer en detalle en el/los siguiente(s) ejemplo(s).

Progresión a la licenciatura:

La capacidad de realizar estudios de autorización de vacunas depende de la propagación de las infecciones por nCoV en los próximos meses. En África, actualmente hay una capacidad extremadamente limitada para realizar la prueba de diagnóstico para nCoV-2019, y en algunos países, una capacidad limitada para responder si el virus comenzara a propagarse en áreas densamente pobladas.

Si se contiene el brote, la licencia de la vacuna se basará en pruebas de eficacia en modelos animales combinadas con datos de seguridad e inmunogenicidad de ensayos de fase II. Las pruebas de eficacia están disponibles tanto en hurones como en NHP. Estos estudios pueden ampliarse para determinar correlaciones de protección. Si, como el SARS, el brote termina en unos pocos meses, aún sería deseable

continuar el desarrollo de la vacuna hasta un punto en el que estos estudios se hayan completado y se disponga de una reserva de vacunas.

Si no es posible una contención rápida, deben realizarse estudios de eficacia de la vacuna de fase III. El estudio de fase I/II que se describe en el presente documento respalda la planificación continua de nuevos ensayos de fase II y III en muchos países diferentes. El diseño de ensayo más probable sería un ensayo aleatorio controlado con placebo. Actualmente, la tasa de letalidad se estima en el 1-2% y la mayoría de las muertes ocurren en adultos mayores con estados de salud preexistentes y enfermedad leve en la mayoría de la población. Por tanto, el diseño del ensayo se basaría en estudios de eficacia de las vacunas contra la influenza. Puede haber un efecto estacional en la circulación del SARS-CoV2, como ocurre con otros patógenos respiratorios, que deben tenerse en cuenta al planificar los estudios. Sin embargo, después de la transmisión repetida de ser humano a ser humano, pueden seleccionarse mutaciones virales que afecten la transmisibilidad y la gravedad de la enfermedad. La gravedad de la enfermedad puede o bien aumentar o bien disminuir. Una mayor gravedad requeriría reconsiderar la ética de un ensayo aleatorizado controlado con placebo, mientras que una gravedad reducida colocaría al nuevo coronavirus en la misma categoría que otros que circulan actualmente, para los que nunca se ha considerado deseable ninguna vacuna.

Los planes para el eventual despliegue de vacunas deben considerarse al planificar ensayos adicionales. Esto podría ser la vacunación de algunos trabajadores de atención

médica de primera línea, o puede ser necesario considerar la eficacia en la población más vulnerable (adultos mayores con comorbilidades), o los probables superpropagadores (niños pequeños), o toda la población. El diseño de ensayo de fase I/II dado a conocer en el presente documento ya incorpora todos los grupos de edad. Si existiera la necesidad de vacunar a toda la población, incluyendo las poblaciones especiales (mujeres embarazadas, VIH +ve), la tecnología de vacuna descrita en el presente documento es apropiada.

Ejemplo 5

Mecanismo de acción

En los estudios clínicos, se toman muestras de sangre para analizar los anticuerpos IgG usando un ELISA validado y respuestas de células T usando un protocolo ELISpot validado al inicio del estudio y después de la vacunación. Con respecto al protocolo ELISPOT validado, debe observarse que el protocolo ELISPOT real es una técnica estándar que normalmente se lleva a cabo siempre de la misma manera. La especificidad del protocolo ELISPOT validado proviene de los péptidos usados. En esta invención, los péptidos usados se derivan de la proteína de pico del SARS-CoV2. En una realización, se sintetizan una serie de péptidos superpuestos a partir del primer aminoácido de la proteína de pico. En esta realización, se sintetizan péptidos de 20 meros. Por tanto, el primer péptido comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 20 de la proteína de pico del SARS-CoV2; el segundo péptido sintetizado comprende los aminoácidos 11 a 30 de la proteína de pico del SARS-CoV2; el tercer péptido sintetizado comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21 a 40 de la

proteína de pico del SARS-CoV2 y así sucesivamente. Esta colección de péptidos puede agruparse en conjuntos para facilitar la realización del protocolo ELISPOT. Cualquier enfoque adecuado para el agrupamiento de los péptidos puede ser adoptado por el operador experto.

El método y los resultados de ELISPOT en particular se proporcionan a continuación, junto con una lista completa de los péptidos usados en el análisis y los detalles de la estrategia de agrupamiento usada.

Debe observarse que no se espera que ninguna de las otras tecnologías de vacunas en desarrollo se use como una serie primaria de dosis única. Las vacunas de ADN, ARN y proteínas están planificadas como un régimen de vacunación de dos dosis con probablemente 4 semanas entre dosis. Por tanto, la vacuna del inventor es eficaz para generar respuestas inmunitarias excepcionalmente rápidas y parece ofrecer la mejor opción de vacuna para combatir el SARS-CoV2.

En un período de 7 días o más después del desafío, los animales serán sacrificados y los pulmones se examinarán para detectar evidencia de inmunopatología.

Así como la administración intramuscular para los grupos iniciales, se ha incluido la administración de la vacuna en aerosol seguida de una broncoscopia para evaluar las respuestas inmunitarias en la vía respiratoria, con una vacunación intramuscular/broncoscopia para comparar.

Todas estas evaluaciones siguen protocolos bien establecidos que ya se usan en o bien Oxford o bien Imperial. Estos estudios también brindan oportunidades para comparar la inmunogenicidad de la vacuna con la de otras vacunas nCoV en desarrollo clínico o preclínico.

Desarrollo de Química, Fabricación y Control (CMC)

Se conocen vacunas con vectores adenovirales deficientes en replicación.

El gen del adenovirus E1 debe ser suministrado en trans por la línea celular usada para la fabricación de la vacuna. En las células HEK293, este gen está flanqueado por otras secuencias del adenovirus 5 que están presentes en el vector de la vacuna Ad5, de modo que en casos raros un acontecimiento de doble cruce da como resultado la generación de adenovirus con capacidad de replicación. Esto no es deseable y se ha resuelto mediante el uso de un vector adenoviral diferente como ChAdOx1, en el que la homología entre el vector y la línea celular es demasiado baja para permitir la recombinación, o el uso de una línea celular que expresa Ad5 E1 sin secuencias flanqueantes como PerC6, u otras desarrolladas por empresas diferentes.

La mejora adicional de la línea celular consiste en incluir la capacidad de reprimir la expresión del antígeno de la vacuna durante la fabricación. El antígeno de la vacuna está bajo el control de un fuerte promotor de mamífero para proporcionar un alto nivel de expresión del antígeno después de la vacunación. La expresión del antígeno durante la fabricación puede tener un efecto perjudicial sobre el rendimiento de la vacuna. Al evitar la expresión de la vacuna durante la fabricación, el rendimiento ya no se ve afectado por la elección del antígeno y el procedimiento puede estandarizarse. Se ha tenido acceso a un banco de células cGMP de ese tipo para este proyecto, y ha sido utilizado previamente tanto por Advent (material de fase I/II) como por CanSino (ampliación).

El procedimiento anterior consiste en expandir el banco de células, infectar con el virus semilla y permitir que el adenovirus se replique dentro de las células. Después de la colecta, la lisis con detergente, la clarificación y la purificación posterior se logra mediante métodos estándar que ya existen tanto en Advent como en CanSino. Luego se diluye el principio activo purificado en tampón de formulación, se esteriliza por filtración y se llena en viales que pueden almacenarse como líquidos o liofilizados. Las pruebas de control de calidad incluyen concentración (que es el ensayo de potencia), esterilidad, secuencia de ADN del antígeno de la vacuna y ausencia de agentes adventicios. El uso de la secuenciación profunda ha acelerado en gran medida recientemente la caracterización de las disoluciones madre de semillas de vacunas, para confirmar la clonalidad sin largas rondas de clonación de virus, y también en la detección de agentes adventicios. Por tanto, el tiempo necesario para las pruebas de liberación puede reducirse considerablemente.
Con el fin de iniciar la fabricación de cGMP, la instalación de biofabricación clínica en Oxford está produciendo una disolución madre de semillas de vacuna que será adecuado para transferir a una sala limpia para la fabricación. Esto se analizará para determinar la concentración, la secuencia del ADN del antígeno, la esterilidad y el micoplasma antes de ser usado por dos fabricantes de vacunas. Advent, en Italia, producirá un lote de 1000 viales para los primeros estudios clínicos. CanSino, en China, también fabricará la vacuna. CanSino comenzará a fabricar una vez que se suministre la

disolución madre de semillas, comenzando con un lote de 200 litros para producir 20,000 dosis.

Todos los ensayos clínicos que se han realizado con vacunas vectorizadas de ChAdOx1 han usado productos terminados GMP. Para ChAdOx1 SARS-CoV2, el lote inicial de GMP de 1000 dosis proporciona suficiente para realizar el ensayo clínico de fase I/II que se da a conocer anteriormente.

Al mismo tiempo que se transfiere el stock de semilla de vacuna a Advent para fabricar las primeras 1000 dosis, la disolución madre de semilla de vacuna se transfiere a CanSino para permitir la fabricación a mayor escala.

RESUMEN/CRONOGRAMA

- Vacuna ChAdOx1 SARS-CoV2 para estudios preclínicos generada
  - Finalizado el 18 de febrero de 2020
- Las pruebas preclínicas incluyendo estudios de inmunogenicidad iniciales en ratones seguidos de estudios de eficacia en hurones y NHP
  - Implementado bajo acuerdo en NIH y CSIRO
- Disolución madre de semilla de vacuna adecuada para la fabricación de cGMP generada
  - Finalizado el 6 de marzo de 2020
- Fabricación de lotes de vacuna de fase I/II de 1000 dosis para cGMP y disponible para ensayos clínicos
  - En curso
- Obtener la aprobación ética y reglamentaria para un ensayo en el RU
  - En curso
- Realizar un estudio de Fase I/II, proporcionando datos de seguridad e inmunogenicidad en adultos, adultos mayores y niños.

o En curso

• Fabricación de vacunas a gran escala (200 litros, aproximadamente 20,000 dosis por lote al principio)

o En curso (Transferencia de disolución madre de semillas)

Ejemplo 6

Estos estudios iniciales prueban la inmunogenicidad de una sola dosis de vacuna. Las respuestas tanto de las células B como T se evalúan después de dos semanas. Las respuestas de IgG se evalúan con un ensayo ELISA usando proteína producida por Keith Chapell (UQ Australia). El anticuerpo neutralizante se mide usando un virus pseudotipado que lleva la proteína de pico del nCoV en la superficie. Este ensayo se ha usado para verificar el receptor de entrada 2019-nCoV verificado (https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.22.915660v1). Las respuestas de las células T se miden en un ensayo ELISpot utilizando péptidos que cubren la secuencia completa de la proteína de pico.

La vacuna se proporciona a los laboratorios de Rocky Mountain, NIH, para estudios de eficacia y vacunación de primates no humanos. Un grupo recibe una vacuna de control con proteína fluorescente verde ChAdOx1 (GFP), uno con una dosis única de ChAdOx1 SARS-CoV2 y otro con dos dosis administradas con cuatro semanas de diferencia, con exposición del virus después de cuatro semanas adicionales. Se lleva a cabo un estudio histopatológico completo después del estudio de desafío para evaluar cualquier posible inmunopatología.

Los inventores afirman que los NHP se protegen por vacunación sin replicación viral después de la exposición y sin evidencia de inmunopatología.

Se lleva a cabo un estudio adicional de eficacia de la vacuna en hurones, realizado por PHE o por CSIRO si la capacidad se limita en PHE. Este consta de los mismos grupos que en el estudio NHP pero con un cuarto grupo vacunado con ChAdOx1 nCoV en dos momentos de los cuales se extraen los animales en diferentes momentos después del desafío para evaluar la inmunopatología en los pulmones.

La disolución madre de semillas de vacunas pre-GMP se produce en la Instalación de Biofabricación Clínica, Oxford. Esto se transfiere a Advent para la preparación de un banco de virus maestro y un principio activo. El primer llenado y acabado de la vacuna da como resultado la producción de 1000 viales, con potencial para más en un segundo llenado. Las pruebas de calidad de las vacunas están a cargo de la MHRA con el empleo de métodos de secuenciación profunda para reducir el tiempo necesario para la certificación según la GMP.

El estudio clínico comienza con un aumento de la dosis en voluntarios adultos sanos de entre 18 y 50 años. El enfoque estándar para los estudios First in Human es vacunar inicialmente con la dosis más baja en un solo voluntario. Después de una revisión de seguridad exitosa, se administra la misma dosis a otros dos voluntarios, y el resto del grupo se vacuna cuarenta y ocho horas más tarde después de una revisión de seguridad adicional. La primera dosis será de 2.5x 10 ^10 vp, que, según los inventores, es inmunogénica sin AAG. Si una dosis más alta de 5 x 10 ^10 vp induce fiebres limitadas y de corta duración en algunos

sujetos, entonces puede seleccionarse la dosis más baja o ajustarla en consecuencia. Por tanto, se someten a prueba estas dos dosis y se selecciona una dosis para una evaluación clínica adicional.

Después de la revisión de seguridad de los dos primeros grupos después de una semana después de la vacunación, el estudio continuará en adultos mayores de 50 años y luego en niños en edad escolar. Para los grupos de adultos, se ha reclutado, vacunado y realizado un seguimiento de la evaluación de la inmunogenicidad y la seguridad de los voluntarios vacunados.

La revisión de seguridad seguirá los procedimientos estándar con visitas para evaluación a los 2, 7, 14, 28, 56 y 182 días tras la vacunación. Se evalúa la inmunogenicidad el día de la vacunación más los días 7, 14, 28, 56 y 182 en adultos con un máximo de tres puntos temporales para los niños. Las evaluaciones de inmunogenicidad incluyen ensayos ELISA y ELISpot como criterios de valoración primarios de inmunología. Además, se realizan ensayos de neutralización en coronavirus vivos y fenotipado de células T. Las PBMC se congelan y pueden usarse para estudios inmunológicos adicionales que investiguen la amplitud de la respuesta o para la preparación de anticuerpos monoclonales.

Los estudios descritos aquí representan la mejor práctica para el desarrollo de vacunas contra el nuevo coronavirus y se llevan a cabo en GCP lo más rápido posible. Los estudios clínicos van seguidos de estudios de escalada y reducción de la edad. Los grupos de edad que van a incluirse permiten evaluar el rendimiento potencial de la vacuna en los trabajadores de la salud, los adultos mayores con riesgo de enfermedad más grave y los niños que pueden experimentar

una enfermedad leve pero que transmiten la infección a otros de manera muy eficaz. Después de estos estudios iniciales, continúan las evaluaciones inmunológicas más detalladas, así como los estudios clínicos de eficacia de la vacuna.

Ejemplo 7 Curva de crecimiento de ChAdOx1-2019nCoV

Se cultivaron células en suspensión HEK293 TREx en los siguientes medios:

Constituyente	**Proveedor**
Medios 1L CD293	Fisher 11913019
5 ml de FBS	Sigma F2442
1 ml de 100x Pen / Estrep	Sigma P0781
20 ml de Glutamina 200 mM	Sigma G7513
100Ml de Blasticidina 10 mg/ml	Melford Labs B1105
10 ml de agente antiaglutinante	Fisher 0010057DG
20 ml de HEPES 1 M	Sigma H0887

Las células HEK 293 TREx expresan la proteína represora de tetraciclina que se une a sitios en el promotor CMV del adenovirus recombinante y previene la expresión de la proteína de pico del nCoV-19 durante la producción de ChAOx1 nCoV-19 en estas células. La expresión de la proteína represora tet se interrumpe cuando se añade tetraciclina al medio de cultivo, lo que permite que se exprese la proteína de pico del nCoV-19.

El día antes de la infección, las células HEK293 TREx se sedimentaron y resuspendieron en medio mínimo (CD293, FBS al 1%, L-glutamina 5 mM y pen/estrep), se contaron mediante exclusión con azul tripán y se sembraron a 1x10e6/ml. Se dejó crecer el matraz de cultivo durante la noche (37°C, CO_2 al 5%, dentro de una incubadora orbital).

El día de la infección, las células se contaron mediante exclusión con azul tripán y se ajustaron a 1x10e6/ml con medios mínimos. Las células se dividieron en alícuotas en volúmenes de 80 ml en matraces de cultivo nuevos y se hicieron diversas adiciones a cada matraz:

Matraz 1: MOI 3 reprimido: 8 µl de Blasticidina + virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 3

Matraz 2: MOI 3 sin reprimir: 80 µl de tetraciclina 1 mg/ml + virus MOI 3

Matraz 3: MOI 1 reprimido: 8 µl de Blasticidina + virus MOI 1

Matraz 4: MOI 0.3 reprimido: 8 µl de Blasticidina + virus MOI 0.3

Se volvieron a incubar los matraces (37°C, CO_2 al 5%)

De las células no infectadas, se tomó un volumen de 500 µl y se sedimentó. El sedimento y el sobrenadante se almacenaron a -80°C por separado para usarlos como control negativo en qPCR.

A las 24, 48 y 72hpi se tomaron las siguientes muestras:

A- 500µl: sedimentados por centrifugación y tanto el sobrenadante como el sedimento se almacenaron por separado a -80°C para ser analizados por qPCR.

B- 2ml: sedimentado por centrifugación. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo independiente. El sedimento celular se resuspendió primero en 140 µl de

tampón de lisis de ChAdOx1 que contenía nucleasa. Luego el volumen total se completó hasta 200 µl usando NaCl 5 M. Se agitó con vórtex la muestra. Tanto el sedimento celular como las muestras de sobrenadante se colocaron a -80°C para usarlas en ensayos de titulación inmunitaria para calcular las UI.

C- Cuantificación de unidades infecciosas (UI):

Se cuantificó UI usando un inmunoensayo de título. En resumen, se sembró una placa de 96 pocillos de pared negra/fondo plano transparente (Corning) con células HEK293 TREx adherentes en medio de crecimiento estándar (abajo) para obtener una monocapa confluente al 95% en el día requerido.

Constituyente	**Proveedor**
500 ml de DMEM 1x	Sigma D6546 o Gibco 21969035
50 ml de FBS	Sigma F2442
5 ml de 100x Pen / Estrep	Sigma P0781
10 ml de Glutamina 200 mM	Sigma G7513
250 µl de Blasticidina 10 mg/ml	Melford Labs B1105
10 ml de HEPES 1 M	Sigma H0887

Las muestras para valorar se descongelaron, se agitaron en vórtex y se tomó una alícuota de 10 µl para someter a prueba. Esto se mezcló con 90 µl de medio de cultivo para producir una dilución de 10^{-1}. Se hicieron diluciones adicionales en medio de crecimiento estándar (10^{-2} a $1{,}1x10^{-7}$) por duplicado por muestra a través de una placa de 96 pocillos con fondo en V vacía. Se retiró el medio de la placa de ensayo y se sembraron en placa 50 µl de cada

muestra de prueba/dilución. Se incubaron las placas durante 24 h (37°C, CO_2 al 8%) antes de que se añadieran otros 50 µl de medio de cultivo estándar. La placa se volvió a colocar en la incubadora durante 24 h más. Después de un total de 48 h, se aspiraron todos los contenidos de los pocillos y se fijaron las células con 100 µl de metanol enfriado previamente por pocillo. Se colocaron las placas a -20°C durante la noche.

Para inmunoteñir, todas las etapas de incubación se realizaron a temperatura ambiente: las placas se lavaron (x5) con PBS antes de bloquearlas primero con 100 µl por pocillo de Bloxall (Vector Labs) durante 30 minutos y luego con 200 µl por pocillo de disolución de caseína al 1% (Thermo Fisher) durante 15 minutos después de lavar (x5) con PBS. Se añadió a los pocillos el anticuerpo anti-hexón adenoviral (AbCam) diluido en una disolución de caseína al 1% (100 µl/pocillo). Después de 1 h, se eliminó el anticuerpo primario y se lavaron las placas (x8) con TBS 1x (solución salina tamponada con Tris - Sigma). El anticuerpo secundario (molécula entera de IgG anti-ratón de cabra, Sigma) se diluyó en TBS que contenía leche desnatada en polvo al 3%. Esto se añadió 100 µl/pocillo antes de 1 hora más de incubación. Las placas se lavaron de nuevo (x8) en 1xTBS antes de añadir 100 µl por pocillo de BCIP/NBT por pocillo para visualizar las células infectadas. Una vez que los 'puntos' se tiñeron bien, se eliminó BCIP/NBT, se lavó la placa (x5) en agua del grifo y se dejó secar durante la noche. Se obtuvieron imágenes de cada pocillo usando el lector AID Elispot y se contaron distintos puntos en pocillos donde se podían ver 20-200. Se evaluó el título de

UI calculando el factor de dilución de cada muestra dada y el número de puntos contados en esa dilución.

Resultados:

Figura 1: UI total dentro de un cultivo de 80 ml infectado en MOI 3 con y sin represión

Los cultivos reprimidos y deprimidos dieron una UI de virus similar en todos los puntos de tiempo sometidos a prueba.

Figura 2: la UI total disminuye de manera dependiente de la dosis según la MOI

Cuantificación del número de copias del genoma dentro de los cultivos:

Se tomaron muestras del almacenamiento a -80°C y se descongelaron a temperatura ambiente. Se resuspendieron las muestras de sedimento en 500 µl de agua de grado molecular para devolverlas a su volumen de concentración anterior en cultivo.

Se diluyeron todas las muestras 10 µl en DNArealeasy 15 µl (Anachem) y se usó el siguiente programa de PCR para generar la plantilla de ADN viral:

65°C durante 15 min, 96°C durante 2 min, 65°C durante 4 min, 96°C durante 1 min, 65°C durante 1 min, 96°C durante 30 s.

Para una curva estándar, se diluyó ADN plasmídico de ChAdOx1 de una concentración conocida para generar una muestra de un número de copias dado por pocillo. Se preparó la mezcla maestra de qPCR usando 2x mezcla de sonda Luna (NEB), cebadores específicos de ChAdOx2 (Thermo Fisher), sonda universal específica de ChAdOx1 (TAMRA / FAM) (Applied Biosystems) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 15 µl por muestra. Se mezcló la mezcla maestra y se añadieron 15 µl a los pocillos relevantes de

una placa de PCR óptica MicroAmp FAST de 96 pocillos. Se añadieron plantilla/patrón de plásmido/muestras (5 µl por pocillo) a los pocillos de prueba relevantes. Se ejecutó una película óptica para cubrir la placa antes de ejecutar el programa qPCR relevante en una máquina StepOne qPCR. Programa de PCR: 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. Se analizaron los datos recuperados usando los resultados de la curva estándar para generar el número de copias del genoma viral por pocillo, que se calculó adicionalmente para proporcionar copias del genoma por ml de cultivo.
Para comparar el título de UI entre reprimido y reprimido, los valores del número de copias del genoma del cultivo reprimido se establecieron al 100% y el gráfico siguiente muestra la diferencia del cultivo reprimido en comparación con este.

Resultados:

Figura 3: El número de copias del genoma dentro de los matraces se representa como un porcentaje que estandariza el 100% como resultado del cultivo sin reprimir.

Los datos indican que el número de copias del genoma es similar en ambas condiciones bajo prueba.

Ejemplo 8

Un estudio de fase 2/3 para evaluar la eficacia y seguridad de una vacuna basada en adenovirus recombinante contra la enfermedad por coronavirus (COVID-19)

Un estudio simple ciego, aleatorizado de seguridad y eficacia, con subestudios de inmunogenicidad en grupos de mayor y menor edad

Ensayo principal de eficacia: Adultos sanos de ≥18 años.

Subestudios secuenciales de inmunogenicidad de escalada/disminución de la edad:

1. Adultos sanos de 56 a 70 años, inclusive
2. Adultos sanos de 71 años o más
3. Niños sanos de 5 a 15 años, inclusive

Número total para inscribirse: 3,000 - 5,250 participantes

Grupos de escalada/desescalada de edad secuencial:

Adultos del grupo 1 de 56 - 70 años:

ChAdOx1-nCOV19 5x1010vp, N=30

O

Placebo, solución salina inyectable, N= 30

Adultos del grupo 2 de edad 71+ años:

ChAdOx1-nCOV19 5x1010vp, N=50

O

Placebo, solución salina inyectable, N= 50

Niños del grupo 3 de 5 - 15 años:

ChAdOx1-nCOV19 2.5x1010vp, N=30

O

Placebo, solución salina inyectable, N= 30

Estudio de eficacia principal: 5280 participantes

Adultos del grupo 4 de edad ≥18 años:

ChAdOx1-nCOV19 5x1010vp, N= hasta 2500

O

Placebo, solución salina inyectable, N= hasta 2500

Duración planificada de la prueba	6 – 12 meses por participante

Objetivo	**Medida de resultado**

Principal:	Investigar la seguridad y eficacia de la vacuna ChAdOx1-nCOV19 en adultos sanos de ≥18 años de edad.	Seguridad: 1. reacciones adversas locales y sistémicas durante 7 días después de la vacunación en un subconjunto de 100 participantes. 2. Acontecimientos Adversos Graves Eficacia: Casos sintomáticos virológicamente confirmados (PCR positivos) de COVID-19
Secundarios:	Evaluar la inmunogenicidad celular y humoral de ChAdOx1 nCoV-19	a) Respuestas de inmunospot unido a enzima (ELISpot) de interferón-gamma (IFN-γ) a la proteína de pico del SARS-CoV-2; b) Ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas

		(ELISA) para cuantificar los anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 (tasas de seroconversión); c) ensayos de anticuerpos neutralizantes de virus (NAb) frente al virus vivo y/o pseudotipo del SARS-CoV-2
	Investigar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna ChAdOx1-nCOV19 en adultos sanos de 56-70 años y de 71 años o más	Anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 medidos por ELISA el día 28 después de la vacunación. Proporción con un aumento de 4 veces en los anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 medida por ELISA el día 28 después de la vacunación.

	Investigar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna ChAdOx1-nCOV19 en niños sanos de 5-15 años.	Anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 medidos por ELISA el día 28 después de la vacunación. Proporción con un aumento de 4 veces en los anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 medida por ELISA el día 28 después de la vacunación.
	Investigar el impacto de la vacuna ChAdOx1-nCOV19 en infecciones graves por COVID19	1. Hospitalización por infección por COVID19 2. Ingreso en UCI por infección por COVID19 3. Muerte por infección por COVID19
Terciario	Inmunología exploratoria	a) Análisis celular mediante ensayos de citometría de flujo

		b) Ensayos de anticuerpos funcionales c) Otros
	Medir la exposición a COVID-19	Informado mediante una encuesta semanal para recopilar información sobre casos entre contactos domésticos y amigos, contacto con el público en general, procedimientos de control de infecciones
Productos de investigación	ChAdOx1-nCoV-19, un vector adenoviral de simio de replicación deficiente que expresa la proteína de pico (S) del SARS-CoV-2 Disolución al 0.9% de cloruro de sodio para inyección	
Formulación	Líquido	
Vía de Administración	Intramuscular (IM)	
Dosis por Administración	Grupo 1, 2 y 4: 5 x 10^{10} VP Grupo 3: 2.5 x 10^{10} VP	

Ejemplo 9

Tener un grupo de tres ratones hembra BALB/c y un grupo de cinco ratones hembra CD-1 de 6-10 semanas de edad. Tener un grupo de dos ratones hembra BALB/c y un grupo de tres ratones hembra CD-1 de 6-10 semanas de edad. Se inyectó cada ratón por vía intramuscular con el volumen de vacuna requerido. Para vacunaciones por vía intramuscular: Se realizan inyecciones administrando 50 uL en el muslo. Después de 9 días se sacrificaron los ratones BALB/c, después de diez días se sacrificaron los ratones CD-1. Se recolectaron los bazos de estos ratones y se realizó un ensayo ELIspot como se detalla a continuación y se describe en otra parte (PMID: 23485942).

Se recubrieron placas ELISpot con 50 µl por pocillo de mAb de recubrimiento (por ejemplo, IFN-γ anti-ratón AN18 diluido a 5 µg/ml en tampón de recubrimiento). Se prepara una suspensión de células individuales del bazo mediante trituración mecánica, lisis y centrifugación diferencial tal como se describe en otra parte (PMID: 23485942). Se incubaron los esplenocitos con péptidos (1-4 ug/ml) que abarcan toda la proteína de pico codificada en la vacuna ChAdOx1 nCoV-19. El péptido 1 tenía la secuencia MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO: 16); el péptido 2 tenía la secuencia LVLLPLVSSQCVNLT (SEQ ID NO: 17); el péptido 3 tenía la secuencia PLVSSQCVNLTTRTQ (SEQ ID NO: 18) y así sucesivamente hasta e incluyendo el péptido 316. Los péptidos 317 a 321 se superpusieron a 15 meros de la misma manera, pero con la secuencia de tPA. Se desarrollaron y analizaron placas ELISpot, los datos se presentan a continuación.

Grupo 1: péptidos 1-77 inclusive; 317-321 inclusive. **Grupo 2:** Péptidos de 78 a 167 inclusive. **Grupo 3:** Péptidos de 168 a 241 inclusive. **Grupo 4:** Péptidos de 242 a 316 inclusive.

Figura 4. (a) Respuestas de ELISpot de IFN-γ esplénicas sumadas de ratones BALB/c (panel izquierdo) y CD-1 (panel derecho), en respuesta a péptidos que abarcan la proteína de pico de SARS-CoV-2, nueve o diez días después de la vacunación, con 1.7×10^{10} vp ChAdOx1 nCoV-19 u 8×10^{9} vp ChAdOx1 GFP. Se representan los medios con SEM

Figura 5. Diagrama de caja y bigotes de las densidades ópticas después del análisis ELISA de sueros de ratón BALB/C (panel superior) incubados con proteína purificada que abarca el dominio S1 (izquierda) o proteína purificada que abarca el dominio S2 (derecha) del pico de SARS-CoV-2 nueve o diez días después de la vacunación, con 1.7×10^{10} vp ChAdOx1 nCoV-19 u 8×10^{9} vp ChAdOx1 GFP. Diagramas de caja y bigotes de las densidades ópticas después del análisis ELISA de sueros de ratón CD-1 (panel superior) incubados con proteína purificada que abarca el dominio S1 (izquierda) o proteína purificada que abarca el dominio S2 (derecha) del pico de SARS-CoV-2.

Ejemplo 10 : Conjunto de la Vacuna

Propiedades y formulación físicas, químicas y farmacéuticas

Descripción de ChAdOx1 nCoV-19

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 consiste en el vector de adenovirus de simio de replicación deficiente ChAdOx1, que contiene el antígeno de la glicoproteína de superficie estructural (proteína de pico) del SARS CoV-2 (nCoV-19) expresado bajo el control del promotor CMV, con una principal secuencia señal del activador tisular del

plasminógeno (tPA). Se ha mostrado que la secuencia líder de tPA es beneficiosa para mejorar la inmunogenicidad.
El nombre en clave del principio activo es ChAdOx1 nCoV-19. No hay una Denominación común internacional recomendada (DCI).
El fármaco ChAdOx1 nCoV-19 tiene un tamaño de genoma de 35,542 pb y es un líquido congelado ligeramente opaco, esencialmente libre de partículas visibles. La apariencia depende de la concentración del virus y del tampón en el que se formula el virus.

Vector ChAdOx1

El vector ChAdOx1 es de replicación deficiente, ya que se ha eliminado la región del gen E1, esencial para la replicación viral. Esto significa que el virus no se replicará en las células del cuerpo humano. El locus E3 también se elimina en el vector ChAdOx1. ChAdOx1 se propaga solo en células que expresan E1, tales como las células HEK293 y sus derivados o líneas celulares similares como Per.C6 (Crucell).

Conjunto de cepa de vacuna ChAdOx1 nCoV-19

La vacuna consiste en el vector de adenovirus de chimpancé atenuado ChAdOx1, que expresa la proteína de pico del CoV-2 del SARS bajo el control del promotor de CMV. Se generó el plásmido pre-adenoviral pBAC ChAdOx1 nCoV19 y se preparó en el Instituto Jenner de la Universidad de Oxford. El ADNc de pico del CoV-2 del SARS que incluye una secuencia líder de tPA N-terminal de 32 aminoácidos, obtenida de GeneArt, se insertó en el locus E1 de ChAdOx1 mediante recombinación Gateway. De manera adecuada, se usa el "promotor de CMV largo". Esto se conoce en la técnica, y se describe en el documento PCT/GB2008/001262 (WO/2008/122811).

Se usaron los siguientes constructos de ADN:

- n.° p5727: ADNc de pico de SARS CoV-2 en el vector de ADN pMK
- n.° p1990: Vector de plásmido pENTR que contiene el promotor 'largo' de CMV (con sitios del operador del intrón A y Tet; CMVLP TO) y la secuencia poli A de BGH.
- n.°p5710: el vector del plásmido pENTR que contiene el antígeno de pico del CoV entre el promotor CMVLP TO 'largo' y las secuencias poli A de BGH.
- n.°p2563: vector pBAC ChAdOx1 con E1 y E3 eliminados, y E4 modificado para mejorar el rendimiento y la expresión de hexones para titulación sin marcadores. Se generó en el Instituto Jenner, y se conoce su secuencia completa del genoma

El antígeno de pico del CoV-2 del SARS se escindió de n.° p5727 usando NotI y KpnI y se ligó en un corte de n.° 1990 con las mismas enzimas para obtener n.° p5710. Se verificó el inserto mediante mapeo de restricción y secuenciación. Luego se realizó la recombinación de la puerta de enlace entre el n.° 5710 y el n.° 2563.

La secuencia de la región transgénica en ChAdOx1 nCoV-19 se ha verificado mediante la secuenciación directamente del ADN genómico viral purificado con fenol.

El mapa de ADN de n.° p5713 pBAC ChAdOx1 nCoV-19 usado para generar la vacuna de vector viral recombinante se muestra en la Figura 6.

En más detalle, se utiliza el plásmido p5713 pDEST-ChAdOx1-nCOV-19 en la producción de la composición de acuerdo con la presente invención. Específicamente, el plásmido codifica un vector viral de acuerdo con la invención. La secuencia viral se escinde de p5713 pDEST-ChAdOx1-nCOV-19 y

el ADN viral lineal se utilizó posteriormente para transfectar células que expresan E1, tales como células HEK293-TRex, para la producción de la vacuna viral.
SEQ ID NO: 25 – Secuencia de ADN de p5713 pDEST-ChAdOX1 nCoV-19. Formato: ADN (hebra superior), 44104 nucleótidos. Características notables

- Promotor de CMV "largo" (CMVLP) que contiene el intrón A y sitios del operador de Tet (TO) para la represión de la expresión del transgén en células que expresan el represor de Tet
- Marco de lectura abierto de proteína de pico del CoV-2 del SARS optimizado con codones sintéticos
- señal poliA BGH
- Secuencias de recombinación específicas de sitio flanqueantes utilizadas para la inserción de transgenes.
- Gen de resistencia al cloranfenicol en la estructura principal del vector BAC
- Sitios PmeI para la liberación del genoma viral

Ejemplo 11

Título del ensayo: Un estudio de fase I/II para determinar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna candidata contra la enfermedad por coronavirus (COVID-19) ChAdOx1 nCoV-19 en voluntarios adultos sanos del RU

Referencia del Estudio: COV001

Versión del Protocolo: 0.5

Fecha: 12 de marzo de 2020

Número de EudraCT: 2020-001072-15

Referencia de IRAS: 281259

Diseño	Simple ciego, aleatorizado, controlado con placebo, multicéntrico

Población Adultos sanos de 18-55 años.

Tamaño de muestra planificado Hasta 510

Grupo	W0	W4
1a (n = 44) Seguimiento intenso	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$vp	-
1b (n = 44) Seguimiento intenso	Placebo salino	
2a (n = 206)	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$vp	-
2b (n = 206)	Placebo salino	-
3 (n=10) Sensibilización-refuerzo	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$vp	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$vp

Duración planificada de la prueba 6 meses desde la inscripción con visita opcional de 12 meses

	Objetivo	**Medida de resultado**
Principal:	Evaluar la eficacia del candidato ChAdOx1 nCoV-19 frente a COVID-19	a) Casos sintomáticos virológicamente confirmados (PCR positivos) de COVID-19

Coprimario	Evaluar la seguridad de la vacuna candidata ChAdOx1 nCoV	a) aparición de acontecimientos adversos graves (AAG) durante la duración del estudio.
Secundarios:	Evaluar el perfil de seguridad, tolerabilidad y reactogenicidad de la vacuna candidata ChAdOx1 nCoV	a) aparición de signos y síntomas de reactogenicidad local solicitados durante los 7 días siguientes a la vacunación; b) aparición de signos y síntomas de reactogenicidad sistémica solicitados durante los 7 días siguientes a la vacunación; c) aparición de acontecimientos adversos (AA) no solicitados durante 28 días después de la vacunación; d) cambio de la línea de base para las medidas de laboratorio de seguridad y;

		e) Aparición de episodios de mejora de la enfermedad
	Evaluar la eficacia del candidato ChAdOx1 nCoV-19 frente a COVID-19 grave y no grave	a) Ingresos hospitalarios asociados con COVID-19 b) Ingresos en unidades de cuidados intensivos (UCI) asociados con COVID-19 c) Muertes asociadas con COVID-19 d) Seroconversión frente a antígenos del SARS-CoV-2 sin pico
	Evaluar la inmunogenicidad celular y humoral de ChAdOx1 nCoV-19	a) Respuestas de inmunospot unido a enzima (ELISpot) de interferón-gamma (IFN-γ) a la proteína de pico del SARS-CoV-2; b) Ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) para cuantificar los

		anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 (tasas de seroconversión); c) ensayos de anticuerpos neutralizantes de virus (NAb) frente al virus vivo y/o pseudotipo del SARS-CoV-2
Exploratoria	Inmunología exploratoria	a) Análisis celular mediante ensayos de citometría de flujo b) Ensayos de anticuerpos funcionales c) Otros

El análisis de muestras para completar los criterios de valoración exploratorios se puede realizar según el protocolo del banco de tejidos de investigación del Biobanco de OVC (REC: 16/SC/0141).

Productos de investigación	a) ChAdOx1 nCoV-19, un vector adenoviral de simio de replicación deficiente que expresa la proteína de pico (S) del SARS-CoV-2 b) Disolución al 0.9% de cloruro de sodio para inyección

Formulación	Líquido
Vía de Administración	Por vía intramuscular (IM) en la región deltoidea del brazo
Dosis por Administración	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$ vp Solución salina para inyección al mismo volumen requerido en los brazos de investigación

ABREVIATURAS

AdHu	Adenovirus humano
AdHu5	Serotipo 5 de adenovirus humano
AA	Acontecimiento adverso
AID	Enfermedad autoinmunitaria
CCVTM	Centro de vacunación clínica y medicina tropical, Oxford
CBF	Instalación de fabricación biológica clínica
CEF	Fibroblasto de embrión de pollo
ChAd63	Adenovirus de chimpancé 63
IC	Intervalo de confianza
COP	Código de práctica
CRF	Formulario de informe de caso o Centro de investigación clínica
CS o CSP	Proteína Circumsporozoite
CTRG	Oficina de Gobernanza de Investigación y Ensayos Clínicos, Universidad de Oxford
CTL	Linfocito T citotóxico
DSUR	Informe de actualización de seguridad de desarrollo
ELISPOT	Inmunospot unido a enzimas
GCP	Buenas prácticas clínicas

GMO	Organismo genéticamente modificado
GMT	Título medio geométrico
GP	Médico general
GSK	GlaxoSmithKline
HCG	Gonadotropina coriónica humana
HBV	Virus de la hepatitis B
HEK	Riñón embrionario humano
HCV	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRA	Autoridad de Investigaciones Sanitarias
HTLV	Virus linfotrópico T humano
IB	Folleto del investigador
ICH	*Conferencia Internacional de Armonización*
ICMJE	*Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas*
ICS	*Tinción de citocinas intracelulares*
IDT	Impfstoffwerk Dessau-Tornau Biologika GmbH
ID	Intradérmica
IFNγ	Interferón gamma
IM	Intramuscular
IMP	Producto medicinal en investigación
IMP-D	Dossier de medicamentos en investigación
IV	Intravenoso
LSOC	Médico de supervisión de seguridad local
ME-TRAP	Múltiples epítopos y proteína de adhesión relacionada con trombospondina
MHRA	Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios
MVA	Virus vaccinia Ankara modificado

NANP	Fosfatasa del ácido N-acetilneuramínico
NHS	Servicio Nacional de Salud
NIH	Institutos Nacionales de Salud
NIHR	Instituto Nacional de Investigaciones en Salud
PBMC	*Célula mononuclear de sangre periférica*
Pb	*Plasmodium Berghei*
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IP	Investigador principal
pfu	Unidad formadora de placas
QP	Persona cualificada
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QS21	Molécula de saponina de *Quillaja saponaria*
REC	Comité de Ética en Investigación
AAG	Acontecimiento Adverso Grave
SC	Subcutáneo
SmPc	Resumen de las Características del Producto
SOP	Procedimiento Operativo Estándar
SUSAR	Sospecha de reacción adversa grave inesperada
µg	microgramo
vp	Partícula viral
VV	Vector viral
OMS	Organización Mundial de la Salud

3.1 Antecedentes

Un coronavirus novedoso, conocido como 2019-nCoV [1] posteriormente se renombró como SARS-CoV-2 porque es similar al coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), un betacoronavirus de linaje B. El SARS-CoV-2 pertenece al linaje filogenético B del género *Betacoronavirus* y reconoce la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de entrada [4].

La proteína de pico es una glicoproteína transmembrana trimérica de tipo I ubicada en la superficie de la envoltura viral de los CoV, que se puede dividir en dos subunidades funcionales: la S1 N-terminal y la S2 C-terminal. S1 y S2 son responsables de la unión del receptor celular a través del dominio de unión al receptor (RBD) y de la fusión del virus y las membranas celulares, respectivamente, mediando así la entrada de SARS-CoV-2 en las células diana. [3] Los papeles de S en la unión del receptor y la fusión de membranas lo convierten en un objetivo ideal para el desarrollo de vacunas y antivirales, ya que es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes.

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 consiste en el vector de adenovirus de simio de replicación deficiente ChAdOx1, que contiene el antígeno de la glicoproteína de superficie estructural (proteína de pico) del SARS CoV-2 (nCoV-19), con una principal secuencia señal del activador tisular del plasminógeno (tPA). ChAdOx1 nCoV-19 expresa una secuencia codificante de codón optimizado para la proteína de pico a partir del registro a la secuencia del genoma GenBank: MN908947. Se ha demostrado que la secuencia líder de tPA es

beneficiosa para mejorar la inmunogenicidad de otra vacuna CoV vectorizada ChAdOx1 (ChAdOx1 MERS) [5].

3.2.1 Inmunogenicidad

Se inmunizaron los ratones (balb/c y CD-1) con ChAdOx1 que expresaba la proteína de pico del SARS-CoV-2 o la proteína verde fluorescente (GFP). Se recogieron bazos para evaluar las respuestas de IFY ELISpot y se tomaron muestras de suero para evaluar las respuestas de anticuerpos S1 y S2 en ELISA a los 9 o 10 días después de la vacunación. Los resultados de este estudio muestran que una dosis única de ChAdOx1 nCoV fue inmunogénica en ratones.

Figura 4. Respuestas de ELISpot de IFN-γ esplénicas sumadas de ratones BALB/c (panel izquierdo) y CD-1 (panel derecho), en respuesta a péptidos que abarcan la proteína de pico de SARS-CoV-2, nueve o diez días después de la vacunación, con 1.7×10^{10} vp ChAdOx1 nCoV-19 u 8×10^{9} vp ChAdOx1 GFP. Se representan los medios con SEM

Figura 5. Diagrama de caja y bigotes de las densidades ópticas después del análisis ELISA de sueros de ratón BALB/C (panel superior) incubados con proteína purificada que abarca el dominio S1 (izquierda) o proteína purificada que abarca el dominio S2 (derecha) del pico de SARS-CoV-2 nueve o diez días después de la vacunación, con 1.7×10^{10} vp ChAdOx1 nCoV-19 u 8×10^{9} vp ChAdOx1 GFP. Diagramas de caja y bigotes de las densidades ópticas después del análisis ELISA de sueros de ratón CD-1 (panel superior) incubados con proteína purificada que abarca el dominio S1 (izquierda) o proteína purificada que abarca el dominio S2 (derecha) del pico de SARS-CoV-2.

3.2.2 Eficacia

Se están realizando estudios preclínicos de eficacia de ChAdOx1 nCoV-19 en hurones y primates no humanos.

1.2 Razón fundamental

La epidemia de COVID-19 ha causado importantes trastornos en los sistemas de salud con importantes impactos socioeconómicos. Las medidas de contención no han logrado detener la propagación del virus, que se acerca rápidamente a los niveles pandémicos. Actualmente no hay tratamientos específicos disponibles contra COVID-19 y se necesita con urgencia el desarrollo acelerado de vacunas.

Los virus vivos atenuados han estado históricamente entre las plataformas más inmunogénicas disponibles, ya que tienen la capacidad de presentar múltiples antígenos a lo largo del ciclo de vida viral en sus conformaciones nativas. Sin embargo, la fabricación de virus vivos atenuados requiere complejas medidas de contención y bioseguridad. Además, los virus vivos atenuados portan el riesgo de una atenuación inadecuada que provoque una enfermedad diseminada, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos. Dado que la enfermedad grave y el COVID-19 fatal afectan de manera desproporcionada a los adultos mayores con comorbilidades, preparar una vacuna de virus vivo atenuado es una opción menos viable. Los vectores virales competentes para la replicación podrían representar una amenaza similar para la enfermedad diseminada en los inmunosuprimidos. Sin embargo, los vectores de replicación deficiente evitan ese riesgo al tiempo que mantienen las ventajas de la presentación de antígenos nativos, la obtención de inmunidad de células T y la capacidad de expresar múltiples antígenos [9]. En

general, las vacunas de subunidades requieren el uso de adyuvantes y, aunque las vacunas de ADN y ARN pueden ofrecer ventajas de fabricación, a menudo son poco inmunogénicas y requieren múltiples dosis, lo que es altamente indeseable en el contexto de una pandemia.
Se han administrado los vectores de la vacuna de adenovirus de chimpancé de manera segura a miles de personas usando una amplia gama de objetivos de enfermedades infecciosas. Se han administrado vacunas vectorizadas de ChAdOx1 a más de 320 voluntarios sin problemas de seguridad y se ha mostrado que son altamente inmunogénicas en la administración de una dosis única. De relevancia, una dosis única de una vacuna vectorizada ChAdOx1 que expresa proteína de pico de longitud completa de otro betacoronavirus (MERS-CoV) ha mostrado que induce anticuerpos neutralizantes en ensayos clínicos recientes. Los datos generados en este estudio se utilizarán para respaldar más estudios de eficacia de fase II/III más amplios, que incluirán grupos objetivo con mayor riesgo de enfermedad grave.

4. OBJECTIVOS Y CRITERIOS DE VALORACIÓN

Objetivos	**Medidas de resultado**	**Momento(s) de tiempo de evaluación de esta medida de resultado**
Objetivo primario Evaluar la eficacia del ChAdOx1 nCoV-19	a) Casos sintomáticos virológicamente confirmados (PCR positivos) de COVID-19	Durante todo el estudio

frente a COVID-19		
Objetivo coprimario Evaluar la seguridad de la vacuna candidata ChAdOx1 nCoV	a) aparición de acontecimientos adversos graves (AAG) durante la duración del estudio.	Durante todo el estudio
Objetivos secundarios. Evaluar el perfil de seguridad, tolerabilidad y reactogenicidad de la vacuna candidata ChAdOx1 nCoV	a) aparición de signos y síntomas de reactogenicidad local solicitados durante los 7 días siguientes a la vacunación; b) aparición de signos y síntomas de reactogenicidad sistémica solicitados durante los 7 días siguientes a la vacunación; c) aparición de acontecimientos adversos (EA) no solicitados durante 28 días después de la vacunación;	Día 0-6 Síntomas autoinformados registrados usando diarios electrónicos Día 0-6 Síntomas autoinformados registrados mediante diarios electrónicos Día 0-27 Síntomas autoinformados registrados usando diarios electrónicos Muestras de sangre extraídas al momento de la

	d) cambio de la línea de base para las medidas de laboratorio de seguridad y; f) Aparición de AAG de interés especial: episodios de mejora de la enfermedad	inscripción (antes de la vacunación), día 2, 7 y 28 Durante todo el estudio
Evaluar la eficacia del ChAdOx1 nCoV-19 frente a COVID-19	a) Ingresos hospitalarios asociados con COVID-19 b) Ingresos en unidades de cuidados intensivos (UCI) asociados con COVID-19 c) Muertes asociadas con COVID-19 d) Seroconversión frente a antígenos sin pico medida por ELISA	Durante todo el estudio Durante todo el estudio Durante todo el estudio Muestras de sangre extraídas en D0, D28 y D182 (D364 opcional)
Evaluar la inmunogenicidad celular y humoral de ChAdOx1 nCoV-19	a) Respuestas de inmunospot unido a enzima (ELISpot) de interferón-gamma (IFN-γ) a la	Véase los horario de asistencia

	proteína de pico del SARS-CoV-2; b) Ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) para cuantificar los anticuerpos contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 (tasas de seroconversión); c) ensayos de anticuerpos neutralizantes de virus (NAb) frente al virus vivo y/o pseudotipo del SARS-CoV-2	
Objetivos exploratorios Inmunología exploratoria	a) Análisis celular mediante ensayos de citometría de flujo b) Ensayos de anticuerpos funcionales c) Otros	Véase los horario de asistencia

El análisis de muestras para completar los criterios de valoración exploratoria puede realizarse según el protocolo del Biobanco OVC aprobado éticamente.

5. DISEÑO DEL ENSAYO

Este es un estudio de fase I/II, simple ciego, controlado con placebo, aleatorizado individualmente en adultos sanos de 18-55 años reclutados en el RU. Se administrará ChAdOx1 nCoV-19 o placebo salino mediante una inyección intramuscular en el deltoides. El estudio evaluará la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19. Habrá 3 grupos de estudio con 250 voluntarios en cada brazo de vacuna (ChAdOx1 nCoV-19 o solución salina) en los grupos 1 y 2 combinados y 10 participantes en el grupo 3 con un tamaño de muestra general de 510 (Tabla 1). La asignación al azar se llevará a cabo en una proporción de intervención a placebo de 1:1. Solo los participantes inscritos en los grupos 1 y 2 serán asignados al azar. Los participantes del grupo 3 no estarán cegados.

La inscripción escalonada se aplicará a los primeros voluntarios que reciban el IMP como se describe en la sección 7.4.2.2. Los participantes serán reclutados primero en los grupos 1 y 3. Una vez que los grupos 1 y 3 estén completamente reclutados, los voluntarios posteriores se inscribirán en el grupo 2.

La seguridad se evaluará en tiempo real y las revisiones provisionales se programan después de que 1, 4, 54 y 100 participantes hayan recibido el IMP.

El DSMB evaluará periódicamente los datos de seguridad y eficacia cada 4-8 semanas y/o según sea necesario.

Se hará un seguimiento de los participantes durante la duración del estudio para registrar los acontecimientos adversos y los episodios de casos de COVID-19 sintomáticos confirmados virológicamente. Se adoptará una definición de protocolo de los casos de COVID-19 para fines de análisis.

Los casos de COVID-19 y acontecimientos relacionados se definirán como:

a) Síntomas de fiebre y/o infección de la vía respiratoria superior asociados con una PCR positiva para SARS-CoV-2
b) Ingreso hospitalario asociado con PCR positiva para SARS-CoV-2
c) Ingresos en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) asociados con una PCR positiva para el SARS-CoV-2
d) Muerte asociada con una PCR positiva para SARS-CoV-2
e) Seroconversión en antígenos del SARS-CoV-2 sin pico

La enfermedad COVID-19 moderada y grave se definirá usando criterios clínicos. Los parámetros clínicos detallados se recopilarán de los registros médicos y se alinearán con las definiciones acordadas a medida que surjan. Es probable que estos incluyan, pero no se limiten a, saturación de oxígeno, necesidad de oxigenoterapia, frecuencia respiratoria y otros signos vitales, necesidad de soporte ventilatorio, radiografías y tomografías computarizadas y resultados de análisis de sangre, entre otros parámetros clínicamente relevantes.

5.1 Grupos del Estudio

Tabla 3. Grupos del Estudio

Grupo	**Número de Voluntarios**	**Dosis**	**Ruta**
1a	44	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$ vp	IM
1b	44	Placebo salino	IM
2a	206	ChAdOx1 nCoV-19 $5x10^{10}$ vp	IM

2b	206	Placebo salino	IM
3	10	Sensibilización-Refuerzo Homólogo $5x10^{10}$ vp	IM

5.2 Voluntarios del Ensayo

Se reclutarán para el estudio voluntarios adultos sanos de 18-55 años. Los voluntarios se considerarán inscritos inmediatamente después de la administración de la primera vacuna.

5.3 Definición de Fin de Prueba

El final del ensayo es la fecha del último ensayo realizado con la última muestra recolectada.

5.4 Duración del estudio

La duración total del estudio será de 6 meses a partir del día de la inscripción para todos los voluntarios con un seguimiento opcional de 12 meses.

6.1 Identificación de los voluntarios de prueba

Los adultos sanos en el RU serán reclutados mediante el uso de un anuncio +/- formulario de registro aprobado formalmente por los comités de ética. Todos los voluntarios firmarán y fecharán el formulario de consentimiento informado antes de realizar cualquier procedimiento específico del estudio.

Criterios de Inclusión

El voluntario debe cumplir con todos los criterios siguientes para ser elegible para el estudio:

- Adultos sanos de 18-55 años.
- Capaz y dispuesto (en opinión del investigador) de cumplir con todos los requisitos del estudio.

- Dispuestos a permitir que los investigadores discutan el historial médico del voluntario con su médico general y accedan a todos los registros médicos cuando sea relevante para los procedimientos del estudio.
- Solo para las mujeres, disposición para practicar métodos anticonceptivos continuos y eficaces (véase a continuación) durante el estudio y una prueba de embarazo negativa en los días de la prueba de detección y la vacunación.
- Acuerdo de abstenerse de donación de sangre durante el transcurso del estudio.
- Proporcionar consentimiento informado por escrito.

Criterios de exclusión

El voluntario no puede participar en el estudio si se cumple alguna de las siguientes condiciones:

- Recibo previo de cualquier vacuna (autorizada o en investigación) ≤ 30 días antes de la inscripción
- Recepción planificada de cualquier vacuna distinta de la intervención del estudio dentro de los 30 días antes y después de cada vacunación del estudio.
- La recepción previa de una vacuna en investigación o autorizada que pueda afectar la interpretación de los datos del ensayo (por ejemplo, vacunas con vectores de adenovirus, cualquier vacuna contra el coronavirus).
- Administración de inmunoglobulinas y/o cualquier producto sanguíneo dentro de los tres meses anteriores a la administración planificada de la vacuna candidata.
- Cualquier estado inmunosupresor o inmunodeficiente confirmado o sospechado, incluyendo la infección por VIH; asplenia; infecciones graves recurrentes y uso

crónico (más de 14 días) de medicamentos inmunosupresores en el plazo de los últimos 6 meses (se permiten esteroides inhalados y tópicos).

- Antecedentes de enfermedad alérgica o reacciones que puedan verse agravadas por cualquier componente de la vacuna.
- Cualquier antecedente de angioedema hereditario o angioedema idiopático.
- Cualquier antecedente de anafilaxia en relación con la vacunación.
- Embarazo, lactancia o voluntad/intención de quedar embarazada durante el estudio.
- Historia de cáncer (excepto carcinoma basocelular de piel y carcinoma cervical in situ).
- Antecedentes de afección psiquiátrica grave que probablemente afecte la participación en el estudio.
- Trastorno hemorrágico (por ejemplo, deficiencia de factor, coagulopatía o trastorno plaquetario) o antecedentes de hemorragia o hematomas importantes después de inyecciones intramusculares o venopunción.
- Cualquier otra enfermedad crónica grave que requiera la supervisión de un especialista hospitalario
- Abuso de alcohol actual sospechado o conocido según se define por una ingestión de alcohol de más de 42 unidades por semana.
- Abuso de drogas inyectables sospechado o conocido en los 5 años anteriores a la inscripción.
- Cualquier hallazgo anormal clínicamente significativo en la bioquímica de detección, análisis de sangre hematológicos o análisis de orina.

- Cualquier otra enfermedad, trastorno o hallazgo significativo que pueda aumentar significativamente el riesgo para el voluntario debido a la participación en el estudio, afectará la capacidad del voluntario para participar en el estudio o afectará la interpretación de los datos del estudio.
- Historia de laboratorio confirmado COVID-19.

6.3.3 Criterios de exclusión de revacunación

Los siguientes AA asociados con cualquier vacuna, o identificados el día de la vacunación o antes, constituyen contraindicaciones absolutas para la administración posterior de un IMP al voluntario en cuestión. Si ocurre cualquiera de estos eventos durante el estudio, el sujeto será retirado del estudio y el equipo clínico o su médico de cabecera le hará un seguimiento hasta la resolución o estabilización del acontecimiento:

- Reacción anafiláctica tras la administración de la vacuna
- Embarazo

6.1.1 Contracepción eficaz para mujeres voluntarias

Se requiere que las voluntarias en edad fértil utilicen un método anticonceptivo eficaz durante el transcurso del estudio (es decir, hasta su última visita de seguimiento).

6.1.2 Prevención del 'Exceso de Voluntariado'

Los voluntarios serán excluidos del estudio si participan simultáneamente en otro ensayo en el que se administró un IMP en el plazo de los 30 días anteriores a la inscripción, o se administrará durante el período de ensayo.

6.1.3 Retirada de voluntarios

Según los principios de la revisión actual de la Declaración de Helsinki y cualquier otra reglamentación

aplicable, un voluntario tiene derecho a retirarse del estudio en cualquier momento y por cualquier motivo, y no está obligado a dar sus razones para hacerlo.
Si un voluntario se retira del estudio, los datos y las muestras de sangre extraídas antes de su retiro aún se usarán en el análisis. El almacenamiento de muestras de sangre continuará a menos que el participante solicite específicamente lo contrario.
En todos los casos de retirada de sujetos, la recopilación de datos de seguridad a largo plazo, incluyendo algunos procedimientos como las muestras de sangre de seguridad, continuará según corresponda si los sujetos han recibido una o más dosis de vacuna, a menos que rechacen cualquier seguimiento posterior.

6.2 Embarazo

Si una voluntaria queda embarazada durante el ensayo, no se administrará IMP del estudio adicional. Se le hará un seguimiento para una evaluación de seguridad clínica con su consentimiento continuo y, además, se le hará un seguimiento hasta que se determine el resultado del embarazo.

7 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

Esta sección describe los procedimientos del ensayo para evaluar a los participantes del estudio y el seguimiento después de la administración de la vacuna del estudio.

7.1 Horario de asistencia

Todos los voluntarios del grupo 1 tendrán el mismo horario de asistencia y procedimientos a la clínica que se indica en los horarios de asistencia (Tabla 6). El Grupo 2 tendrá las asistencias y los procedimientos de la clínica como se indica en los horarios de asistencias a continuación (tablas 7). El Grupo 3 tendrá las asistencias y los

procedimientos de la clínica como se indica en los horarios de asistencias a continuación (tablas 8). Los sujetos recibirán la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 o un placebo de solución salina y se someterán a un seguimiento durante un total de 6 meses con una visita opcional 1 año después de la inscripción. El volumen total de sangre donada durante el estudio será de 225 a 420 mL, dependiendo del grupo al que estén asignados. Se pueden realizar visitas o procedimientos adicionales a criterio de los investigadores, por ejemplo, más historial médico y examen físico, microscopía de orina en caso de análisis de orina positivo o análisis de sangre adicionales si son clínicamente relevantes.

7.2 Observaciones

El pulso, la presión arterial y la temperatura se medirán en los puntos de tiempo indicados en el programa de procedimientos y también se pueden medir como parte de un examen físico si se indica en otros puntos de tiempo.

7.3 Análisis de sangre y análisis de orina

Se extraerá sangre para las siguientes pruebas de laboratorio y se procesará en los laboratorios acordados de NHS Trust usando los procedimientos estándar del NHS:

- **Hematología;** Recuento de sangre completa
- **Bioquímica;** Sodio, Potasio, Urea, Creatinina, Albúmina, Pruebas de función hepática (ALT, ALP, Bilirrubina)
- **Serología diagnóstica;** HBsAg, anticuerpos contra el VHC, anticuerpos contra el VIH (se obtendrá el consentimiento específico antes de analizar la sangre para estos virus transmitidos por la sangre)
- **Inmunología;** Tipificación del antígeno leucocitario humano (HLA)

Se pueden realizar análisis de sangre de seguridad adicionales si son clínicamente relevantes a discreción de los investigadores médicamente calificados.
En los laboratorios de investigación de la Universidad de Oxford:

- **Inmunología;** La inmunogenicidad se evaluará mediante una variedad de ensayos inmunológicos. Esto puede incluir anticuerpos contra antígenos de pico del SARS-CoV y sin pico mediante ELISA, ensayos ELISpot *ex vivo* para interferón gamma y ensayos de citometría de flujo, neutralización y otros ensayos de anticuerpos funcionales y análisis de células B. Otros ensayos inmunológicos exploratorios, incluyendo el análisis de citocinas y otros ensayos de anticuerpos, el análisis de ADN de polimorfismos genéticos potencialmente relevantes para la inmunogenicidad de la vacuna y los estudios de expresión génica, entre otros, pueden realizarse a criterio de los investigadores.
- **Análisis de orina;** Se analizará la orina para detectar proteínas, sangre y glucosa en el examen. Solo para las mujeres voluntarias, se analizará la orina para detectar gonadotropina coriónica humana beta (β-HCG) en el momento de la selección e inmediatamente antes de la vacunación.

Las muestras que se almacenarán para futuras investigaciones se transferirán al Biobanco OVC (REC 16/SC/0141).

7.4 Visitas de estudio

Los procedimientos que se incluirán en cada visita se documentan en el horario de asistencia (Tablas 6-8).

7.4.1 Visita de selección

Todos los posibles voluntarios tendrán una visita de selección, que puede tener lugar hasta 90 días antes de la vacunación. Se tomará el consentimiento informado antes de la selección.

Si es elegible, se programará una visita del día 0 para que el voluntario reciba la vacuna y el seguimiento posterior.

7.4.2 Día 0: Visita de inscripción y vacunación

Los voluntarios se considerarán inscritos en el ensayo en el momento de la vacunación. Antes de la intervención de vacunación/ensayo, se revisará la elegibilidad del voluntario. Se observarán el pulso, la presión arterial y la temperatura y, si es necesario, puede realizarse un historial médico y un examen físico para determinar la necesidad de posponer la vacunación. Las vacunas se administrarán tal como se describe a continuación.

7.4.2.1 Vacunación

Se administrarán todas las vacunas y las inyecciones de placebo de solución salina por vía intramuscular según los SOP específicos. El lugar de la inyección se cubrirá con un apósito estéril y el voluntario permanecerá en el lugar del ensayo para observación, en caso de acontecimientos adversos inmediatos. Se tomarán observaciones 60 minutos después de la vacunación (+/- 30 minutos) y se quitará el apósito estéril y se inspeccionará el lugar de la inyección.

En todos los grupos, los voluntarios recibirán un termómetro oral, cinta métrica y una tarjeta de diario (en papel o electrónica), con instrucciones de uso, junto con el número de teléfono de emergencia las 24 horas para comunicarse con el médico del estudio de guardia si es

necesario. Se instruirá a los voluntarios sobre cómo autoevaluar la gravedad de estos AA. También habrá espacio en la tarjeta del diario para autodocumentar AA no solicitados y si se tomó medicación para aliviar los síntomas. Las tarjetas de diario recopilarán información sobre el momento y la gravedad de los siguientes AA solicitados:

Tabla 4. *AA solicitados recogidos en las tarjetas de diario posteriores a la vacunación*

AA locales solicitados	**AA solicitados sistémicos**
Dolor	Fiebre
Sensibilidad	Febrilidad
	Escalofríos
Enrojecimiento	Dolor en las articulaciones
Calor	Dolores musculares
Comezón	Fatiga
Hinchazón	Cefalea
Induración	Malestar
	Náuseas

7.4.2.2 Secuencia de inscripción y vacunación de voluntarios
Antes del inicio del estudio, cualquier dato de seguridad disponible recientemente se revisará a partir de estudios en animales o ensayos clínicos de vacunas contra el coronavirus que se estén sometiendo a prueba en otro lugar y se discutirá con el DSMB y/o MHRA según sea necesario. Por razones de seguridad, el primer voluntario que reciba el IMP será vacunado antes que cualquier otro participante y el perfil de acontecimientos adversos se revisará después

de 48 horas (± 24 horas) después de la vacunación. Siempre que no existan problemas de seguridad, según lo evaluado por los investigadores y/o el presidente de DSMB, otros 3 voluntarios serán vacunados con el IMP después de que hayan transcurrido al menos 48 horas (± 24 h) después de la primera vacunación y al menos 1 hora de diferencia de cada otro. El perfil de los AA será evaluado por investigadores médicamente calificados en tiempo real y después de 48 horas (± 24 h) de los primeros 4 participantes que recibieron el IMP, se continuarán las vacunas siempre que no haya problemas de seguridad. Se pedirá a los investigadores pertinentes y al presidente de DSMB que tomen una decisión sobre si se pueden continuar con más vacunas después de que los primeros 4 participantes hayan recibido el IMP. También se puede consultar un DSMB completo en caso de que surjan problemas de seguridad en este punto.

Se realizará una revisión basada en los datos de seguridad acumulados de los primeros 54 participantes que recibieron el IMP. La inscripción de hasta 100 participantes solo procederá si el CI y/u otros investigadores relevantes designados y el presidente del DSMB evalúan los datos como indicativos de que es seguro hacerlo. En este punto, cualquier nuevo dato inmunopatológico de los estudios de exposición preclínica en hurones y primates no humanos será evaluado por el CI y/u otros investigadores relevantes designados y el DSMB antes de la inscripción de hasta 100 participantes.

Se realizará una segunda revisión basada en los datos de seguridad acumulados de 100 participantes que recibieron el IMP antes de inscribir al resto de participantes en el

estudio. La inscripción de los 160 participantes restantes que reciben el IMP solo procederá si el CI y/u otros investigadores relevantes designados y el DSMB evalúan los datos como indicativos de que es seguro hacerlo. La tabla a continuación proporciona una estimación de la secuencia de reclutamiento

Si otros lotes de IMP están disponibles, se aplicarán los mismos procedimientos de inscripción escalonada a estos nuevos lotes

7.4.3 Visitas posteriores:

Las visitas de seguimiento se realizarán según el cronograma de asistencias descrito en las tablas 6-8 con sus respectivas ventanas. Los voluntarios serán evaluados en busca de acontecimientos adversos locales y sistémicos, historial interino, examen físico, revisión de tarjetas de diario (en papel o electrónico) y análisis de sangre en estos puntos de tiempo como se detalla en el programa de asistencia. También se extraerá sangre con fines inmunológicos.

Si los voluntarios experimentan acontecimientos adversos (de laboratorio o clínicos), que el investigador (médico), el presidente de CI y/o DSMB determinen necesarios para una observación más cercana, el voluntario puede ser admitido en un hospital del NHS para observación y tratamiento médico adicional bajo el cuidado de el Consultor de guardia.

7.4.4 Participantes en cuarentena

Dada la evolución de la situación epidemiológica tanto a nivel mundial como en el RU, en caso de que un participante esté en cuarentena y no pueda asistir a ninguna de las visitas programadas, se organizará una consulta telefónica

para obtener los datos básicos del estudio cuando sea posible.

7.4.5 Cambios en los números de grupo

Si se requieren otros lotes de IMP para completar la dosificación en el ensayo, se aplicarán los mismos procedimientos de inscripción escalonada descritos en la sección 7.4.2.2. En este caso, el tamaño de la muestra en el grupo 1 se aumentará en 88 participantes por nuevo lote, sin aumentar el tamaño de la muestra general (es decir, el número de participantes en el grupo 2 se reducirá en el mismo número). Esto es para garantizar que los datos de seguridad e inmunogenicidad sean comparables en diferentes lotes.

Tabla 6 Horario de asistencia de los participantes del grupo 1

Número de asistencia	1S	2	3	4	5	6	7	8	9
Cronología** (días)	≤ 90	0	2	7	14	28	56	182	364 (Opcional)
Ventana de tiempo (días)			±1	±2	±3	±7	±7	±14	±30
Consentimiento informado	X								
Revisar contraindicaciones, criterios de inclusión y exclusión.	X	X							
Vacunación		X							
Signos vitales^	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comprobación de acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X	X	X
Tarjetas de diario proporcionadas		X							

Tarjetas de diario recolectadas						X			
Historial médico, examen físico	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Bioquímica, Hematología (mL)	5	5	5	5		5			
Inmunología exploratoria (mL)		50		10	50	50	50	50	50
Análisis de orina	X								
HCG urinaria (solo mujeres)	X	X							
Tipificación HLA (mL)		4							
HBsAg, HCV Ab, serología de VIH (mL)	5								
Volumen de sangre por visita	10	59	5	15	50	55	50	50	50
Volumen de sangre acumulado%	10	69	74	89	139	194	244	294	344

S = visita de selección; (X) = si se considera necesario ^ = Los signos vitales incluyen pulso, presión arterial y temperatura;

** El cronograma es solo aproximado. Los horarios exactos de las visitas se relacionan con el día de la inscripción, es decir, cada visita debe ocurrir en el número indicado de días después de la inscripción ± ventana de tiempo.
% de Volumen de sangre acumulado para los voluntarios de Oxford si se extrae sangre según el programa, y excluyendo cualquier análisis de sangre de seguridad repetido que pueda ser necesario.

Tabla 7 Horario de asistencia de los participantes del grupo 2

Número de asistencia	1S	2	3	4	5
Cronología** (días)	≤ 90	0	28	182	364 (Opcional)
Ventana de tiempo (días)			±7	±14	±30
Consentimiento informado	X				
Revisar contraindicaciones, criterios de inclusión y exclusión.	X	X			
Vacunación		X			
Signos vitales^	X	X	X	X	X
Comprobación de acontecimientos adversos		X	X	X	X
Tarjetas de diario proporcionadas		X			
Tarjetas de diario recolectadas			X		
Historial médico, examen físico	X	(X)	(X)	(X)	(X)
Bioquímica, Hematología (mL)	5	5	5		
Inmunología exploratoria (mL)		50	50	50	50

Análisis de orina	X				
HCG urinaria (solo mujeres)	X	X			
Tipificación HLA (mL)		4			
HBsAg, HCV Ab, serología de VIH (mL)	5				
Volumen de sangre por visita	10	59	55	50	50
Volumen de sangre acumulado%	10	69	124	174	224

S = visita de selección; (X) = si se considera necesario ^ = Los signos vitales incluyen pulso, presión arterial y temperatura;

** El cronograma es solo aproximado. Los horarios exactos de las visitas se relacionan con el día de la inscripción, es decir, cada visita debe ocurrir en el número indicado de días después de la inscripción ± ventana de tiempo.

% de Volumen de sangre acumulado para los voluntarios de Oxford si se extrae sangre según el programa, y excluyendo cualquier análisis de sangre de seguridad repetido que pueda ser necesario.

Tabla 8 Horario de asistencia de los participantes del grupo 3

Número de asistencia	1[s]	2 (V1)	3	4	5	6 (V2)	7	8	9	10	11	12
Cronología** (días)	≤ 90	0	2	7	14	28	30	35	42	56	182	364 (opcional)
Ventana de tiempo (días)			±1	±3	±3	±7	±1	±2	±3	±3	±14	±30
Consentimiento informado	X											
Revisar contraindicaciones, criterios de inclusión y exclusión.	X	X				X						
Vacunación		X				X						
Signos vitales^	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comprobación de acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tarjetas de diario proporcionadas		X				X						

Tarjetas de diario recolectadas						X				X		
Historial médico, examen físico	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Bioquímica[$], Hematología (mL)	5	5	5	5		5	5	5		5		
Inmunología exploratoria[£] (mL)		50		10	50	50		10	50	50	50	50
Análisis de orina	X											
HCG urinaria (solo mujeres)	X	X				X						
Tipificación HLA (mL)		4										
HBsAg, HCV Ab, serología de VIH (mL)	5											
Volumen de sangre por visita	10	59	5	15	50	55	5	15	50	55	50	50
Volumen de sangre acumulado[%]	10	69	74	89	139	194	199	214	264	319	369	419

S = visita de selección; (X) = si se considera necesario ^ = Los signos vitales incluyen pulso, presión arterial y temperatura;

** El cronograma es solo aproximado. Los horarios exactos de las visitas se relacionan con el día de la inscripción, es decir, cada visita debe ocurrir en el número indicado de días después de la inscripción ± ventana de tiempo.

% de Volumen de sangre acumulado para los voluntarios de Oxford si se extrae sangre según el programa, y excluyendo cualquier análisis de sangre de seguridad repetido que pueda ser necesario.

7.4.3 Voluntarios sintomáticos

A los participantes que presenten síntomas durante el seguimiento se les indicará que llamen al equipo del estudio, quien luego les asesorará sobre cómo proceder con las pruebas clínicas para COVID-19, según las instrucciones de trabajo del ensayo. Los participantes recibirán recordatorios semanales (correo electrónico o mensajes de texto) para ponerse en contacto con el equipo del estudio si presentan fiebre o síntomas del tracto respiratorio superior y si son admitidos en el hospital por cualquier motivo.

7.4.4 Revisión de observaciones médicas

Con el consentimiento de los participantes, el equipo del estudio solicitará acceso a las observaciones médicas o enviará un formulario de recopilación de datos para que lo complete el personal clínico que atiende cualquier episodio de COVID-19 con asistencia médica. Se recopilará cualquier dato que sea relevante para la determinación de criterios de valoración de eficacia y mejora de la enfermedad (AESI). Es probable que estos incluyan, pero no se limiten a, información sobre ingresos a la UCI, parámetros clínicos como saturación de oxígeno, frecuencia respiratoria y signos vitales, necesidad de oxigenoterapia, necesidad de soporte ventilatorio, resultados de pruebas de imagen y de sangre, entre otros.

7.4.5 Aleatorización, cegamiento y descifrado de códigos

Los participantes serán asignados al azar a la vacuna en investigación o al placebo de solución salina en una asignación 1:1, usando la asignación al azar en bloques. Los tamaños de los bloques reflejarán los números que se contratarán en cada etapa del estudio. El primer bloque

será un bloque de 2 participantes, seguido de un bloque de 6, luego una combinación adicional de bloques de 2, 6 o 10 según sea necesario para cumplir con los totales para la asignación al azar para cada día.

Los participantes inscritos en los grupos 1 y 2 estarán cegados al brazo al que se les asignó, ya sea una vacuna en investigación o un placebo. El personal del ensayo que administra la vacuna no estará cegado. Las vacunas se prepararán fuera de la vista del participante y las jeringas se cubrirán con un objeto/material opaco hasta que estén listas para su administración para asegurar el cegamiento.

Si el estado clínico de un participante requiere romper el código, esto se llevará a cabo según una instrucción de trabajo específica del ensayo y una asignación de grupo enviada al médico tratante, si se cree que la eliminación del cegamiento es relevante y probablemente cambie el manejo clínico.

Los participantes inscritos en el grupo 3 no serán cegados

7.1Fabricación y presentación

7.1.1 Descripción de ChAdOx1 nCoV-19

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 consiste en el vector de adenovirus de simio de replicación deficiente ChAdOx1, que contiene los antígenos de la glicoproteína de superficie estructural (proteína de pico) del SARS CoV-2.

7.2Suministro

ChAdOx1 nCoV-19 ha sido formulado y se ha puesto en vial en la Instalación de Biofabricación Clínica (CBF) de la Universidad de Oxford. En el CBF, la vacuna será certificada y etiquetada para el ensayo por una persona cualificada (QP) antes de transferirla al sitio clínico.

7.3Almacenamiento

La vacuna se almacena a una temperatura nominal de -80°C en un congelador cerrado, en el sitio clínico. Todos los movimientos de las vacunas del estudio se documentarán según el procedimiento operativo estándar (SOP) existente. La responsabilidad, el almacenamiento, el envío y la manipulación de las vacunas se realizarán según los procedimientos operativos estándar y formularios pertinentes.

7.4Administración

El día de la vacunación, se permitirá que ChAdOx1 nCoV-19 se descongele a temperatura ambiente y se administrará en el plazo de 1 hora después de sacarlo del congelador. La vacuna se administrará por vía intramuscular en el deltoides del brazo no dominante (preferiblemente). Se observarán todos los voluntarios en la unidad durante 1 hora (± 30 minutos) tras la vacunación. Durante la administración de los productos en investigación, los medicamentos de soporte vital avanzado y el equipo de reanimación estarán disponibles de inmediato para el manejo de la anafilaxia. Se realizará la vacunación y se manejarán los IMP según los SOP relevantes.

8.5 Fundamento para la dosis seleccionada

Se ha seleccionado la dosis que va a administrarse en este ensayo basándose en la experiencia clínica con el vector de adenovirus ChAdOx1 que expresa diferentes insertos y otras vacunas vectorizadas de adenovirus similares (por ejemplo, ChAd63).

Un primer estudio de escalada de dosis en el hombre que utilizó el vector ChAdOx1 que codifica para un antígeno de la influenza (FLU004), administró de manera segura ChAdOx1

NP+M1 en dosis que oscilan desde 5 x 10^8 hasta 5 x 10^{10} vp. La revisión posterior de los datos identificó una dosis óptima de 2.5 x 10^{10} vp que equilibra la inmunogenicidad y la reactogenicidad. Posteriormente, se ha administrado esta dosis a más de cientos de voluntarios en numerosos estudios de fase 1 más amplios en el Instituto Jenner. Hasta ahora, las vacunas vectorizadas con ChAdOx1 han demostrado ser muy bien toleradas. La gran mayoría de AA han sido de leves a moderados y no ha habido SAR hasta esta fecha.

Se ha administrado de manera segura otro vector de adenovirus de simio (ChAd63) en dosis de hasta 2 x 10^{11} vp con una dosis óptima de 5 x 10^{10} vp, que equilibra la inmunogenicidad y la reactogenicidad.

MERS001 fue el primer ensayo clínico de un vector ChAdOx1 que expresa la proteína de pico de longitud completa de un betacoronavirus independiente, pero relacionado. Hasta la fecha, se ha administrado ChAdOx1 MERS a 31 participantes a dosis que oscilan desde 5x10^9 vp hasta 5x10^{10} vp. A pesar de la mayor reactogeniticidad observada en el 5x10^{10} vp, esta dosis fue segura, con AA autolimitativos y no se registraron SAR. El 5x10^{10} vp fue el más inmunogénico, en cuanto a inducir anticuerpos neutralizantes contra MERS-CoV usando un ensayo de virus vivo (Folegatti et al. Lancet Infect Dis, 2020, en prensa). Dados los hallazgos inmunológicos y el perfil de seguridad observados con una vacuna vectorizada ChAdOx1 frente a MERS-CoV, se eligió la dosis de 5x10^{10} vp para ChAdOx1 nCoV-19.

Como se trata de la primera evaluación en humanos del inserto antigénico del SARS-CoV-2 S, se aplicará una inscripción escalonada para los primeros voluntarios inscritos en el estudio. Se aplicará el mismo

procedimiento, en caso de que estén disponibles otros lotes de ChAdOx1 nCoV-19. Se monitoreará la seguridad de ChAdOx1 nCoV-19 en tiempo real y, en caso de que surjan acontecimientos adversos inaceptables o problemas de seguridad, se reducirán las dosis.

8.7 Placebo

Los participantes asignados al grupo de control recibirán una inyección de placebo de solución salina al 0.9% en lugar de ChAdOx1 nCoV-19. El volumen y el lugar de la inyección serán los mismos que para el brazo de intervención y los participantes estarán cegados en cuanto a qué inyección están recibiendo. Cada cápsula de solución salina solo se usará para un solo participante. Se mantendrá un registro de responsabilidad de la vacuna de la solución salina en cada sitio del ensayo.

8.10 Medicación concomitante

Según lo establecido por los criterios de exclusión, los voluntarios no pueden ingresar al estudio si han recibido: cualquier vacuna en los 30 días anteriores a la inscripción o si hay una recepción planificada de cualquier otra vacuna en el plazo de los 30 días posteriores a cada vacunación, cualquier producto en investigación en el plazo de los 30 días antes de la inscripción o si se planea recibirlo durante el período del estudio, o si hay algún uso crónico (> 14 días) de cualquier medicamento inmunosupresor en el plazo de los 6 meses anteriores a la inscripción o si se planea recibirlo en cualquier momento durante el período del estudio (se permiten los esteroides tópicos e inhalados).

9 EVALUACIÓN DE SEGURIDAD

Se evaluará la seguridad por la frecuencia, incidencia y naturaleza de los AA y EAG que surjan durante el estudio.

9.1 Definiciones

9.1.1 Acontecimiento Adverso (AA)

Un AA es cualquier acontecimiento médico adverso en un voluntario, que puede ocurrir durante o después de la administración de un IMP y no necesariamente tiene una relación causal con la intervención. Por tanto, un AA puede ser cualquier signo desfavorable e involuntario (incluyendo cualquier hallazgo de laboratorio anormal clínicamente significativo o cambio con respecto al valor inicial), síntoma o enfermedad asociado temporalmente con la intervención del estudio, si se considera o no relacionado con la intervención del estudio.

9.1.2 Reacción Adversa (AR)

Un AR es cualquier respuesta indeseada o no intencionada a un IMP. Esto significa que una relación causal entre el IMP y un AA es al menos una posibilidad razonable, es decir, no se puede descartar la relación. Todos los casos que el investigador médico informante considere que tienen una relación causal sospechada razonable con un IMP (es decir, posible, probable o definitivamente relacionado con un IMP) calificarán como AR.

Los acontecimientos adversos que pueden estar relacionados con el IMP se enumeran en el folleto del investigador de cada producto.

9.1.4 Acontecimiento Adverso Grave (AAG)

Un AAG es un AA que da como resultado cualquiera de los siguientes resultados, si se considera o no relacionado con la intervención del estudio.

- Muerte

- Acontecimiento potencialmente mortal (es decir, el voluntario, en opinión del investigador, estaba en riesgo inmediato de muerte por el acontecimiento que ocurrió). Esto no incluye un AA que, de ocurrir en una forma más grave, podría haber causado la muerte.
- Discapacidad o incapacidad persistente o significativa (es decir, interrupción sustancial de la capacidad de uno para realizar las funciones de la vida normal).
- Hospitalización o prolongación de la hospitalización existente, independientemente de la duración de la estancia, aunque sea una medida de precaución para la observación continua. La hospitalización (incluyendo la hospitalización de pacientes hospitalizados o ambulatorios para un procedimiento electivo) por una afección preexistente que no ha empeorado inesperadamente no constituye un AA grave.
- Un acontecimiento médico importante (que puede no causar la muerte, poner en peligro la vida o requerir hospitalización) que puede, según el criterio médico apropiado, poner en peligro al voluntario y/o requerir intervención médica o quirúrgica para prevenir uno de los resultados enumerados anteriormente. Ejemplos de tales eventos médicos incluyen reacción alérgica que requiere tratamiento intensivo en una sala de emergencias o clínica, discrasias sanguíneas o convulsiones que no dan como resultado la hospitalización del paciente.
- Anomalía congénita o defecto congénito.

9.1.5 Reacción Adversa Grave (SAR)

Un AA que es a la vez grave y, en opinión del Investigador o los Patrocinadores informantes, se cree que es posible,

probable o definitivamente debido a un IMP o cualquier otro tratamiento del estudio, según la información proporcionada.

9.1.6 Sospecha de una reacción adversa grave inesperada (SUSAR)

Un SAR, cuya naturaleza y gravedad no concuerda con la información sobre el medicamento en cuestión que figura en el IB.

9.2 Expectativa

En este estudio no se esperan acontecimientos adversos graves relacionados con IMP. Por tanto, se informarán todos los SAR como SUSAR.

9.3 Reacciones adversas previsibles:

Las RA previsibles después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 incluyen dolor en el lugar de la inyección, sensibilidad, eritema, calor, hinchazón, induración, prurito, mialgia, artralgia, dolor de cabeza, fatiga, fiebre, febrilidad, escalofríos, malestar y náuseas.

9.4 Acontecimientos Adversos de Interés Especial

Se monitoreará el aumento de la enfermedad después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19. La enfermedad COVID-19 grave se definirá usando criterios clínicos. Los parámetros clínicos detallados se recopilarán de los registros médicos y se alinearán con las definiciones acordadas a medida que surjan. Es probable que estos incluyan, entre otros, la saturación de oxígeno, la necesidad de oxigenoterapia, la frecuencia respiratoria, la necesidad de soporte ventilatorio, los resultados de las pruebas de imagen y de sangre, entre otros parámetros clínicamente relevantes.

9.5 Causalidad

Para cada AA, el médico delegado de CI llevará a cabo una evaluación de la relación del acontecimiento con la administración de la vacuna. Se realizará una interpretación de la relación causal de la intervención con el AA en cuestión, en función del tipo de acontecimiento; la relación del acontecimiento con el momento de la administración de la vacuna; y la biología conocida de la terapia con vacunas (Tabla 9). Se considerarán e investigarán las causas alternativas del AA, como la historia natural de las condiciones médicas preexistentes, la terapia concomitante, otros factores de riesgo y la relación temporal del acontecimiento con la vacunación. La evaluación de la causalidad tendrá lugar durante las revisiones de seguridad planificadas, los análisis intermedios (por ejemplo, si se activa una regla de espera o detención) y en el análisis de seguridad final, excepto para los AAG, que deben ser asignados por el investigador informante, inmediatamente, como se describe en Informes de seguridad de SOP OVC005 para CTIMP.

0	**Sin relación**	Sin relación temporal con respecto al producto de estudio ***y*** Etiología alternativa (estado clínico, ambiental u otras intervenciones); ***y*** No sigue un patrón conocido de respuesta con respecto al producto del estudio

1	**Improbable**	Relación temporal improbable con respecto al producto de estudio ***y*** Etiología alternativa probable (estado clínico, ambiental u otras intervenciones); ***y*** No sigue un patrón conocido típico o plausible de respuesta con respecto al producto del estudio.
2	**Posible**	Relación temporal razonable con respecto al producto de estudio; ***o*** Acontecimiento que no se produce fácilmente por el estado clínico, el medio ambiente u otras intervenciones; ***o*** Patrón de respuesta similar al observado con otras vacunas
3	**Probable**	Relación temporal razonable con respecto al producto de estudio; ***y*** Acontecimiento que no se produce fácilmente por el estado clínico, el medio ambiente u otras intervenciones ***o*** Patrón de respuesta conocido observado con otras vacunas
4	**Definido**	Relación temporal razonable con respecto al producto de estudio; ***y*** Acontecimiento que no se produce fácilmente por el estado clínico, el medio ambiente u otras intervenciones ***y*** Patrón de respuesta conocido observado con otras vacunas

Tabla 9. *Directrices para evaluar la relación de la administración de la vacuna con respecto a un AA.*

9.6 Procedimientos de notificación para todos los acontecimientos adversos

Todos los AA locales y sistémicos que se produzcan en los 28 días posteriores a cada vacunación observados por el investigador o notificados por el voluntario, atribuidos o no a la medicación del estudio, se registrarán en diarios electrónicos o en la base de datos del estudio. Todos los AA que dan como resultado la retirada de un voluntario del estudio serán objeto de seguimiento hasta que se produzca una resolución satisfactoria, o hasta que se asigne una causalidad no relacionada con el estudio (si el voluntario lo consiente). Los AAG y los Acontecimientos Adversos de especial interés se recopilarán durante todo el período del ensayo.

9.7 Evaluación de la gravedad

La gravedad de los acontecimientos adversos clínicos y de laboratorio se evaluará según las escalas de la Tabla 12, según las escalas de clasificación de toxicidad de la FDA para voluntarios sanos y adolescentes inscritos en ensayos clínicos de vacunas preventivas.

Acontecimiento Adverso	**Grado**	**Intensidad**
Dolor en el lugar de la inyección	1	Dolor que se tolera fácilmente
	2	Dolor que interfiere con la actividad diaria
	3	Dolor que impide la actividad diaria

	4	Visita de urgencia u hospitalización
Sensibilidad	1	Molestia leve al tocar
	2	Malestar con el movimiento
	3	Molestia significativa en reposo
	4	Visita de urgencia u hospitalización
Eritema en el lugar de la inyección*	1	2.5 - 5 cm
	2	5.1 - 10 cm
	3	>10 cm
	4	Necrosis o dermatitis exfoliativa
Induración/Hinchazón en el lugar de la inyección	1	2.5 – 5 cm y no interfiere con la actividad
	2	5.1 - 10 cm o interfiere con la actividad
	3	>10 cm o impide la actividad diaria
	4	Necrosis

Tabla 10. Criterios de clasificación de gravedad para eventos adversos locales* el eritema ≤2.5 cm es una consecuencia esperada de la punción cutánea y, por tanto, no se considerará un acontecimiento adverso

Signos Vitales	**Grado 1 (leve)**	**Grado 2 (moderado)**	**Grado 3 (grave)**	**Grado 4 Potencialmente mortal**

Fiebre (oral)	38.0°C - 38.4°C	38.5°C - 38.9°C	39.0°C - 40°C	> 40°C
Taquicardia (lpm)*	101 - 115	116 – 130	>130	Visita de urgencias u hospitalización por arritmia
Bradicardia (lpm)**	50 – 54	45 – 49	<45	Visita de urgencias u hospitalización por arritmia
Hipertensión sistólica (mmHg)	141 - 150	151 – 155	≥155	Visita de urgencias u hospitalización por hipertensión maligna
Hipertensión diastólica (mmHg)	91 - 95	96 – 100	>100	Visita de urgencias u hospitalización por hipertensión maligna
Hipotensión sistólica (mmHg)***	85 - 89	80 – 84	<80	Visita de urgencias u hospitalización por shock hipotensivo

Frecuencia respiratoria: respiraciones por minuto	17 - 20	21-25	>25	Intubación

Tabla 11. ***Criterios de clasificación de gravedad para observaciones físicas.*** **Tomado después de ≥10 minutos en reposo **Cuando la frecuencia cardíaca en reposo está entre 60 y 100 latidos por minuto. Usar el juicio clínico al caracterizar la bradicardia entre algunas poblaciones de sujetos sanos, por ejemplo, atletas condicionados. ***Solo si es sintomático (por ejemplo, mareado/aturdimiento)*

GRADO 0	Ninguno
GRADO 1	Leve: Malestar transitorio o leve (<48 horas); Sin interferencia con la actividad; No se requiere intervención/terapia médica
GRADO 2	Moderado: Limitación leve a moderada en la actividad: puede ser necesaria alguna ayuda; no requiere intervención/terapia médica o es mínima
GRADO 3	Grave: Limitación marcada en la actividad, en general se requiere alguna asistencia; Se requiere intervención/terapia médica.
GRADO 4	Potencialmente mortal: requiere evaluación en urgencias u hospitalización

Tabla 12. ***Criterios de clasificación de gravedad para AA locales y sistémicos.***

- **Acontecimientos adversos locales solicitados:**
  - Si más del 25% de las dosis de la vacuna en un momento determinado (por ejemplo, Día 0, Día 28) en un grupo de estudio se siguen por el mismo acontecimiento adverso

local solicitado de grado 3 que comienza en el plazo de los 2 días posteriores a la vacunación (día de vacunación y una día siguiente) y persistiendo en el Grado 3 durante> 72 h

- **Acontecimientos adversos sistémicos solicitados:**
  - Si más del 25% de las dosis de la vacuna en un momento determinado (por ejemplo, Día 0, Día 28) en un grupo de estudio se siguen por el mismo acontecimiento adverso sistémico solicitado de grado 3 que comienza en el plazo de los 2 días posteriores a la vacunación (día de vacunación y una día siguiente) y persistiendo en el Grado 3 durante> 72 h

- **Acontecimientos adversos no solicitados:**
  - Si más del 25% de las dosis de la vacuna en un momento determinado (por ejemplo, Día 0, Día 28) en un grupo de estudio se siguen por el mismo acontecimiento adverso no solicitado de grado 3 que comienza en el plazo de los 2 días posteriores a la vacunación (día de vacunación y una día siguiente) y persistiendo en el Grado 3 durante> 72 h

- **Acontecimiento adverso de laboratorio:**
  - Si más del 25% de las dosis de la vacuna en un momento determinado (por ejemplo, Día 0, Día 28) en un grupo de estudio se siguen por el mismo acontecimiento adverso de laboratorio de grado 3 que comienza en el plazo de los 2 días posteriores a la vacunación (día de vacunación y una día siguiente) y persistiendo en el Grado 3 durante> 72 h

9.14.2 Reglas de parada individuales (se aplicarán únicamente al grupo de sensibilización-refuerzo)

Además de las reglas de retención grupal indicadas anteriormente, se aplicarán reglas de detención para voluntarios individuales (es decir, indicaciones para retirar a las personas de vacunas adicionales). Los participantes del estudio que presenten al menos una de las siguientes reglas de interrupción serán retirados de la vacunación adicional en el estudio:

- **Reacciones locales:** Ulceración, absceso o necrosis en el lugar de la inyección
- **AA de laboratorio:**
  el voluntario desarrolla un AA de laboratorio de grado 3 que se considera posible, probable o definitivamente relacionado en el plazo de los 7 días posteriores a la vacunación y que persiste continuamente en el grado 3 durante> 72 horas.
- **Acontecimientos adversos solicitados sistémicos:**
  - el voluntario desarrolla un AA solicitado sistémico de Grado 3 considerado posible, probable o definitivamente relacionado en el plazo de los 2 días posteriores a la vacunación (día de vacunación y un día posterior) y persistiendo continuamente en el Grado 3 durante> 72 horas.
- **Acontecimientos adversos no solicitados:**
  - el voluntario tiene un acontecimiento adverso de Grado 3, considerado posible, probable o definitivamente relacionado con la vacunación, que persiste continuamente en el Grado 3 durante> 72 horas.
  - el voluntario tiene un AAG considerado posible, probable o definitivamente relacionado con la vacunación.

- el voluntario tiene una reacción alérgica aguda o shock anafiláctico después de la administración del producto en investigación de vacuna.

Si un voluntario tiene una enfermedad respiratoria aguda (enfermedad moderada o grave con o sin fiebre) o fiebre (temperatura oral superior a 37.8°C) en el momento programado de administración del producto en investigación/placebo, el voluntario no se inscribirá y será retirado del estudio.

10 ESTADÍSTICA

10.1 Descripción de Métodos de Estadística

El investigador jefe desarrollará y firmará un plan de análisis estadístico completamente detallado antes de realizar cualquier análisis de datos. En resumen, el análisis incorporará lo siguiente;

10.1.1 Eficacia primaria

Los criterios de valoración principales del análisis de eficacia primario incluyen: Casos sintomáticos de COVID-19 positivos por PCR capturados por el Servicio Nacional de Salud.

Solo los acontecimientos que ocurren más de 14 días después de la vacunación se incluirán en las evaluaciones de eficacia para dar tiempo a los receptores de la vacuna para montar una respuesta inmune protectora y proporcionar una estimación más precisa de la EV. La eficacia de la vacuna (EV) se calculará como (1 – RR) x 100%, donde RR es el riesgo relativo de infección sintomática (ChADOx1 nCOV-19: Control) y se presentarán los intervalos de confianza del 95%.

La incidencia acumulada de infecciones sintomáticas se presentará usando el método de Kaplan-Meier

10.1.2 Seguridad primaria

Todos los AA se presentarán para cada grupo mediante análisis descriptivos.

10.1.3 Eficacia secundaria

Los criterios de valoración principales del análisis de eficacia secundario incluyen:

1. Ingresos hospitalarios con PCR positivo para COVID-19
2. Ingresos a la Unidad de Cuidados Intensivos con PCR positivo para COVID-19
3. Muerte por infección por PCR positivo para COVID-19
4. Seroconversión a antígenos de SARS-CoV-2 sin pico

Los criterios de valoración de eficacia secundarios se analizarán de la misma manera que los criterios de valoración primarios.

10.1.4 Seguridad y Reactogenicidad

Se presentarán para cada grupo los recuentos y porcentajes de cada reacción adversa local y sistémica solicitada de las tarjetas de diario, y todos los AA no solicitados y AAG de especial interés.

10.1.5 Inmunogenicidad

Los datos de ELISA muy asimétricos se transformarán logarítmicamente antes del análisis. La concentración media geométrica y el intervalo de confianza del 95% asociado se resumirán para cada grupo en cada punto de tiempo, calculando el anti-log de la diferencia media de los datos transformados logarítmicamente.

Las comparaciones entre grupos se realizarán mediante una prueba de U de Mann Whitney.

10.2 El Número de Participantes

El estudio tiene el poder de detectar una diferencia en proporciones con infección sintomática con COVID-19 entre los que reciben la vacuna en investigación y el control. Si la tasa de ataque de las infecciones sintomáticas por COVID-19 durante el ensayo es del 10% en el grupo de control durante el período de evaluación de la eficacia (después de los primeros 14 días del estudio), entonces el estudio tendrá una potencia del 90% (5% alfa) para detectar una eficacia mínima de la vacuna del 74%. Una tasa de ataque más alta del 20% permitirá la detección de la eficacia de la vacuna tan baja como el 53%. Estos cálculos no asumen pérdidas durante el seguimiento, ya que es probable que los participantes se sientan motivados a seguir participando en el estudio y el período de tiempo para el seguimiento es relativamente corto.

Los participantes del grupo 3 que reciben la vacuna de sensibilización-refuerzo no se incluirán en la evaluación de eficacia, ya que habrá muy pocos participantes en este grupo para permitir una estimación precisa de la tasa de acontecimientos después de un programa de vacuna de sensibilización-refuerzo.

10.3 Análisis combinados

Se espera que el estudio de fase I/II (COV001) y el estudio de fase 2/3 (COV002) se realicen simultáneamente durante un período de alta incidencia de la enfermedad en el RU. Los datos de eficacia de ambos estudios se combinarán en un metanálisis prospectivo para permitir una estimación más precisa de los parámetros de eficacia y seguridad.

Total Tamaño de la muestra*	N1 Control	N2 nCOV-19	Relación Vac: Control	Tasa de ataque control	Tasa de ataque nCOV-19	EV mínima que se puede detectar	Número esperado de casos en el grupo de control	Número esperado de casos en el grupo de nCOV-19
500	250	250	1	0.1	0.026	0.74	25	6
500	250	250	1	0.2	0.094	0.53	50	23

10.3 Procedimiento para representar datos faltantes, no utilizados y espurios.

Todos los datos disponibles se incluirán en el análisis.

10.4 Inclusión en el Análisis

Todos los participantes vacunados serán incluidos en el análisis y serán analizados según la vacuna recibida.

11.5 Calidad de los datos

Las herramientas de recopilación de datos se someterán a una validación adecuada para garantizar que los datos se recopilen de manera precisa y completa. Los conjuntos de datos proporcionados para el análisis estarán sujetos a procedimientos de control de calidad para garantizar que los datos analizados sean un fiel reflejo de los datos de origen.

Los datos de prueba se gestionarán de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de gestión de datos locales. Si se requieren procesos adicionales específicos del estudio, se implementará un Plan de Gestión de Datos aprobado

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL Y GARANTÍA DE CALIDAD

11.1 Procedimientos del investigador

En todos los sitios clínicos y de laboratorio se usarán procedimientos operativos estándar (POE) aprobados específicos del sitio.

11.2 Monitoreo

El monitoreo regular se realizará según GCP por el monitor.

14.1 Declaración de Helsinki

Los investigadores se asegurarán de que este estudio se lleve a cabo según los principios de la revisión actual de la Declaración de Helsinki.

18. Referencias

1. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.* New England Journal of Medicine, 2020. **382**(8): pág. 727-733.
2. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.* Lancet (Londres, Inglaterra), 2020. **395**(10224): pág. 565-574.
3. Li, F., *Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins.* Annual review of virology, 2016. **3**(1): pág. 237-261.
4. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.* Nature, 2020.
5. Alharbi, N.K., et al., *ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising antibodies and cellular immune responses in mice.* Vaccine, 2017. **35**(30): pág. 3780-3788.
6. Antrobus, R.D., et al., *Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored*

vaccine expressing conserved Influenza A antigens. Mol Ther, 2014. **22**(3): pág. 668-74.

7. Coughlan, L., et al., *Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults.* EBioMedicine, 2018.
8. Wilkie, M., et al., *A phase I trial evaluating the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccination regimen, ChAdOx1 85A prime - MVA85A boost in healthy UK adults.* Vaccine, 2020. **38**(4): pág. 779-789.
9. Modjarrad, K., *MERS-CoV vaccine candidates in development: The current landscape.* Vaccine, 2016. **34**(26): pág. 2982-7.
10. Tseng, C.T., et al., *Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus.* PLoS One, 2012. **7**(4): pág. e35421.
11. Weingartl, H., et al., *Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets.* J Virol, 2004. **78**(22): pág. 12672-6.
12. Liu, L., et al., *Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection.* JCI insight, 2019. **4**(4): pág. e123158.
13. Agrawal, A.S., et al., *Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live*

virus. Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(9): pág. 2351-6.

14. Munster, V.J., et al., *Protective efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a transgenic human DPP4 mouse model.* NPJ Vaccines, 2017. **2**: pág. 28.

15. Alharbi, N.K., et al., *Humoral Immunogenicity and Efficacy of a Single Dose of ChAdOx1 MERS Vaccine Candidate in Dromedary Camels.* Sci Rep, 2019. **9**(1): pág. 16292.

Por tanto, se demuestra ChAdOx1 SARS-CoV2 es una vacuna plausible y creíble para los seres humanos.

Ejemplo 12: Demostración en mamíferos

En este ejemplo, los efectos ventajosos de la invención se demuestran en mamíferos. En este ejemplo los mamíferos son ratones.

Se vacunaron por vía intramuscular (IM) dos cepas de ratón (BALB/c, N = 5 y CD1 consanguíneo, N = 8) con ChAdOx1 nCoV-19 (para la construcción/conjunto de ChAdOx1 nCoV-19, véase anteriormente, especialmente los ejemplos).

La serología detallada y la inmunidad celular en profundidad se perfilaron 14 días después.

Los datos se presentan en la Figura 7 y en la Figura 8.

La Figura 7 muestra respuestas específicas de antígeno después de la vacunación con ChAdOx1 nCov19 en ratones (es decir, la administración de la composición de la invención a ratones).

Se administró por vía intramuscular a ratones BALB/cy (CD1) 10^8 µl de ChAdOx nCoV-19 a menos que se indique lo contrario. Normalmente, 14 días después, se recogió suero y se recogieron los bazos y las células estimularon péptidos

que abarcaban la longitud de los dominios S1 y S2 de la proteína de pico nCov19.

A. Título del criterio de valoración (EPT) de la IgG sérica detectada contra la proteína S1 o S2 en ratones BALB/c (círculos) o CD1 (cuadrados).

B. El gráfico muestra las respuestas de ELISpot de IFNg específicas de pico sumadas medidas en ratones BALB/c (círculos) y CD1 (cuadrados) exógenos.

C. Los gráficos muestran la frecuencia sumada de células T CD4 (izquierda) o CD8 (derecha) positivas para citocinas específicas de pico medidas mediante tinción de citocinas intracelulares después de la estimulación de péptidos de esplenocitos en ratones BALB/c (círculos) y CD1 (cuadrados).

La Figura 8 muestra respuestas específicas de antígeno después de la vacunación con ChAdOx1 nCov19 (es decir, la administración de la composición de la invención a ratones).

Se administró por vía intramuscular a ratones BALB/cy (CD1) 10^8 µl de ChAdOx nCoV-19. 14 días después, se recogió suero y se recogieron los bazos y las células estimularon péptidos que abarcaban la longitud de los dominios S1 y S2 de la proteína de pico nCov19.

A: Anticuerpos de subclase IgG detectados frente a la proteína S1 (arriba) o S2 (abajo) en ratones BALB/c (izquierda) o CD1 (derecha).

B. Los gráficos muestran las respuestas de IFNg ELISpot después de la estimulación de esplenocitos con el grupo S1 (negro) o el grupo S2 (gris) en ratones BALB/c (círculo) y CD1 (cuadrado) consanguíneos.

C. Los gráficos muestran la frecuencia de linfocitos T CD4 (arriba) o CD8 (abajo) positivos para citocinas, medida mediante tinción de citocinas intracelulares después de la estimulación de esplenocitos con péptidos del grupo S1 (negro) o del grupo S2 (gris) en BALB/c (círculo) y ratones CD1 (cuadrados).

D. Los gráficos muestran el cambio de veces en los niveles de citocinas en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados S1 (negro) y S2 (gris) en comparación con los esplenocitos no estimulados para ratones BALB/c y CD1.

Se detectaron títulos de IgG totales frente a los dominios S1 y S2 de la proteína de pico del nCoV-19 en todos los ratones vacunados.

Se midió una respuesta predominantemente Th1 según lo evaluado mediante el perfil de subclase de la respuesta de IgG (Fig. 7A y Fig 8A).

Se detectaron respuestas inmunes de células T medidas por ELISpot e ICS en toda la longitud del constructo de proteína de pico (Fig. 7B y Fig. 8B).

Se detectó una respuesta predominantemente de tipo Th1 después de la vacunación respaldada por niveles altos de IFN-g, TNF-a e IL-2 y niveles bajos de IL-4 e IL-10 medidos (Fig. 7C y Fig. 8C, D).

No se esperaba que todos los ratones desarrollaran anticuerpos después de una vacunación de una sola inyección (es decir, una administración única/inmunización de dosis única según la presente invención). Esto es una prueba de que el efecto de la composición de la invención es sorprendentemente eficaz.

No se esperaba que una respuesta celular o humoral tan fuerte que era predominantemente TH1 fuera inducida después

de una vacunación de una sola inyección (es decir, una administración única/inmunización de dosis única según la presente invención). Esto es una evidencia de que las respuestas inmunes inducidas por la composición de la invención/por inmunización según la invención son sorprendentemente fuertes.

Ejemplo 13: Demostración en primates no humanos (NHP)

Aviso de reconocimiento: Se realizó el trabajo experimental descrito en este ejemplo en colaboración con Public Health England Laboratories, Porton Down, Inglaterra.

La enfermedad inducida por la infección por SARS-CoV-2 en macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) parece similar a la de los seres humanos. Se vacunaron los macacos Rhesus con 2.5 x 10^10 (2.5 x 10^{10}) partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19 (N = 3 machos + 3 hembras) administrando 100 µl por vía intramuscular a la pata trasera. El grupo de control (N = 3 machos + 3 hembras) recibió 100 µl del elemento de control (solución salina tamponada con fosfato) por vía intramuscular. Se expusieron todos los animales 4 semanas tras la vacunación con el virus SARS-CoV-2. Tras la administración de un anestésico adecuado, se administró una dosis de 5.0 x 10^6 (5.0 x 10^6) ufp del virus del SARS-CoV-2 en un volumen total de 3 ml de PBS en la vía respiratoria superior e inferior de cada animal en orden para maximizar la probabilidad de infección. Se administraron los primeros 2 ml por vía intratraqueal, seguidos de 2 ml de solución salina estéril, el último 1 ml se administró por vía intranasal dividido entre las fosas nasales. El inóculo de exposición usado fue el virus del SARS-CoV-2, paso 3 de células VERO/hSLAM (Victoria/1/2020).

Se tomaron diariamente observaciones clínicas que incluían peso, temperatura y comportamiento. Se evaluó la carga de enfermedad pulmonar mediante tomografías computarizadas (TC) realizadas 5 días después de la exposición y se midió usando un sistema de puntuación cuantitativa desarrollado para la evaluación de la enfermedad COVID-19 humana. Se dividió cada lado del pulmón en un total de 12 zonas de la siguiente manera: Cada lado del pulmón se dividió (de arriba a abajo) en tres zonas: la zona superior (arriba de la carina), la zona media (de la carina a la vena pulmonar inferior) y la zona inferior (debajo de la vena pulmonar inferior). Luego, se dividió cada zona en dos áreas: la zona anterior (la zona antes de la línea vertical del punto medio del diafragma en la posición sagital) y la zona posterior (la zona después de la línea vertical del punto medio del diafragma en la posición sagital). Las medidas usadas fueron la puntuación total de la enfermedad (puntuación de nódulo + puntuación de opacidad en vidrio esmerilado + puntuación de consolidación) y puntuación de distribución de la enfermedad (número de zonas con enfermedad). Se usaron los siguientes parámetros del sistema de puntuación:

- los nódulos observados por tomografía computarizada se calificaron de 1-4 o más
- la opacidad del vidrio esmerilado (GGO) se puntuó según el tamaño: <1 cm=1, 1-2 cm=2, 2-3 cm = 3, >3 cm=4
- Puntuación de consolidación: <1 cm = 1, 1-2 cm=2, 2-3 cm = 3, >3 cm=4

Se midieron los títulos de anticuerpos neutralizantes reductores de placa (PRNT) en los sueros de macacos usando el siguiente método:

Método PRNT

Se prepararon diluciones en serie dobles a partir de 1:10 de sueros de macacos en placas de 96 pocillos. Se mezcló cada dilución de suero con un volumen igual de virus (aproximadamente 40-70 ufp/pocillo) y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de esta incubación, se transfirió la mezcla de virus-suero a monocapas de células Vero/E6 en placas de 24 pocillos. Después de 1-1.5 h de incubación a 37°C, se recubrieron las monocapas de células con 0.5 ml de medio que contenía carboximetilcelulosa al 1.5%. Después de 5 días, se fijaron las placas con formaldehído. Al día siguiente, se lavaron las placas y se tiñeron con una disolución de violeta cristal al 0.2% durante 5-15 minutos. Se lavaron las placas y se recontaron las placas. Se determinaron los títulos de punto medio de PRNT y los intervalos de confianza del 95% mediante análisis Probit. No se observaron diferencias obvias de peso (Figura 9) o temperatura (Figura 10) entre los grupos vacunados y no vacunados hasta 7 días después de la exposición con el virus. Los cambios de peso fueron variables entre los animales, algunos perdieron peso de manera constante a lo largo del estudio, probablemente como resultado del cambio en el entorno y las interacciones sociales. Sin embargo, no hubo diferencias claras entre los grupos.

Las características de la enfermedad COVID-19 identificadas a partir de tomografías computarizadas recolectadas 5 días después de la exposición (Tabla 13 y Figura 11) mostraron que estaban presentes menos anomalías pulmonares típicas de la enfermedad humana en los animales que recibieron la vacuna ChAdOx1 nCoV19 que en los controles no vacunados.

4 de los 6 animales del grupo vacunado no mostraron características visibles de la enfermedad en comparación con 2 de los 6 controles. Además, la distribución de las anomalías inducidas por COVID-19 en los animales vacunados que desarrollaron la enfermedad fue más restringida que en los animales de control, y la extensión de la anomalía afectó a menos del 25% del pulmón.

Se ha hecho referencia a la Figura 9, que muestra la observación clínica del peso después de la exposición al virus SARS-CoV2 en macacos Rhesus vacunados con ChAdOx1 nCoV-19. Se inmunizaron i.m. los animales con 2.5×10^{10} partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19 (Grupo 1) o solución salina tamponada con fosfato (Grupo 2) y se expusieron 4 semanas más tarde con 5.0×10^{6} ufp del virus SARS-CoV2. Se midieron los pesos de los animales cada día después de la exposición (DPC) y se representaron como cifras absolutas (A. y B.) y el porcentaje de cambio de peso (C. y D.). Cada línea representa un solo individuo.

Se ha hecho referencia a la Figura 10, que muestra la observación clínica de la temperatura después de la exposición al virus SARS-CoV2 en macacos Rhesus vacunados con ChAdOx1 nCoV-19. Se inmunizaron i.m. los animales con 2.5×10^{10} partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19 (Grupo 1) o solución salina tamponada con fosfato (Grupo 2) y se expusieron 4 semanas más tarde con 5.0×10^{6} ufp del virus SARS-CoV2. Se midieron las temperaturas antes de la exposición (A. y B.) y después de la exposición (C. y D.). Cada línea representa un solo individuo. DPC = días después de la exposición.

La Tabla 13 muestra la carga de enfermedad pulmonar medida usando un sistema de puntuación cuantitativa desarrollado

para COVID-19 humano en macacos Rhesus 5 días después de la exposición al virus SARS-CoV2. Se inmunizaron i.m. los animales con 2.5 x 10^{10} partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19 o solución salina tamponada con fosfato (sin vacuna) y se expusieron 4 semanas más tarde con 5.0 x 10^{6} ufp del virus SARS-CoV2.

TABLA 13:

Género	Estado	Puntuación GGO	Consolidación	Nódulo	Total	Zona
			Puntuación	Puntuación	Puntuación	Puntuación
hombres	ChAdOx1 nCov-19	5		1	6	3
hombres	ChAdOx1 nCov-19	3			3	3
hombres	ChAdOx1 nCov-19					
mujeres	ChAdOx1 nCov-19					
mujeres	ChAdOx1 nCov-19					
mujeres	ChAdOx1 nCov-19					
hombres	Sin vacuna	9	4		13	7
hombres	Sin vacuna					
hombres	Sin vacuna	4	2	1	7	5
mujeres	Sin vacuna	1	3		4	4
mujeres	Sin vacuna					
mujeres	Sin vacuna	1	8		9	5

Se ha hecho referencia a la Figura 11, que muestra la carga de enfermedad de COVID-19 a partir de imágenes de TC medidas usando un sistema de puntuación cuantitativa desarrollado para COVID-19 humano en macacos Rhesus 5 días después de la exposición al virus SARS-CoV2. Se inmunizaron i.m. los animales con 2.5 x 1010 partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19 o solución salina tamponada con fosfato (sin vacuna) y se expusieron 4 semanas más tarde con 5.0 x 10^{6} ufp del virus SARS-CoV2. Tendencias no significativas para las diferencias entre los grupos observadas (puntuación total p = 0.1450; puntuación de distribución p = 0.0907) (prueba de Mann Whitney)

Importancia

Dado que no hubo diferencia en el peso total o los resultados de temperatura entre los grupos, fue sorprendente que los animales vacunados con ChAdOx1 nCov-19 tuvieran en puntuaciones de CT más bajas promedio. También fue sorprendente que la dosis de la vacuna usada en este estudio de NHP fue la mitad de la dosis humana completa que se usó en el ensayo clínico. Normalmente, los estudios de NHP usan la dosis humana completa y es sorprendente que se haya observado protección contra la enfermedad después de una única inmunización a la dosis más baja.

Estas observaciones transmiten la eficacia de las formulaciones de la invención para inducir respuestas inmunes, en particular inducir respuestas inmunes protectoras.

Se ha hecho referencia a la Figura 12, que muestra niveles de nAb en 6 macacos en la semana 4 tras la vacunación. En más detalle, la Figura 12 muestra que los títulos de anticuerpos neutralizantes de reducción de placa se determinaron cuatro semanas después de inmunizar seis macacos rhesus con 2.5×10^{10} partículas virales de ChAdOx1 nCoV-19. Todos los animales fueron fuertemente positivos. Cuando se analizaron sueros humanos convalecientes usando el mismo ensayo, los resultados de PRNT parecen estar por encima de 320 (la dilución superior). Los datos de macacos muestran niveles entre 200 - 380 cuatro semanas después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV19. Esto sugiere que se trata de fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes en el rango que esperamos ver en un ser humano después de una infección natural con el virus. Por tanto, estos datos transmiten que de hecho es plausible y creíble que las

formulaciones de la invención sean eficaces para inducir las respuestas inmunes requeridas en sujetos a los que se administran las formulaciones.

Ejemplo 14: Evaluación de la inmunogenicidad de la vacunación de sensibilización-refuerzo

En este Ejemplo, se compara la inmunogenicidad de una o dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 tanto en ratones como en cerdos. Mientras que una dosis única indujo respuestas de anticuerpos específicos de antígeno y de células T, una inmunización de refuerzo mejoró las respuestas de anticuerpos, particularmente en cerdos, con un aumento significativo en los títulos de neutralización del SARS-CoV-2. La prueba de la inmunogenicidad de una o dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones y cerdos informará aún más el desarrollo clínico.

Resultados

Se inmunizaron ratones consanguíneos (BALB/c) y consanguíneos (CD1) vacunados con 'sensibilización-refuerzo' los días 0 y 28 después de la vacunación (dpv), mientras que los ratones 'solo sensibilización' recibieron una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 en el día 28. Se recogieron el bazo y el suero de todos los ratones el día 49 (3 semanas después de la vacunación de sensibilización o refuerzo). El análisis de las respuestas de esplenocitos murinos específicos de la proteína del SARS-CoV-2 S mediante el ensayo ELISpot de IFN-γ no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los regímenes de vacunación de solo sensibilización y de sensibilización-refuerzo, en cualquier cepa de ratón (Figura 13A). La tinción con citocinas intracelulares (ICS) de esplenocitos (Figura 13B) mostró, en ambas cepas de ratón, que la

respuesta fue conducida principalmente por células T $CD8^+$. La respuesta de citocinas predominante tanto de las células T $CD8^+$ como $CD4^+$ fue la expresión de IFN-γ y TNF-α, con frecuencias insignificantes de células $IL\text{-}4^+$ e $IL\text{-}10^+$, en consonancia con datos previos que sugieren que la vacunación adenoviral no induce una respuesta de Th2 dominante. No hubo diferencias significativas en las respuestas de citocinas de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ entre ratones solo con sensibilización y con sensibilización-refuerzo.

Se inmunizaron los cerdos solo con sensibilización y sensibilización-refuerzo en 0 dpv y los cerdos de sensibilización-refuerzo recibieron una segunda inmunización en 28 dpv. Se recolectaron muestras de sangre semanalmente hasta el 42 dpv para analizar las respuestas inmunes. El análisis ELISpot de IFN-γ de células mononucleares de sangre periférica porcina (PBMC) mostró respuestas en 42 dpv (2 semanas después del refuerzo) que fueron significativamente mayores en los cerdos de sensibilización-refuerzo en comparación con los animales de solo sensibilización ($p < 0.05$; Figura 13C). Las respuestas de sensibilización-refuerzo 42 dpv fueron mayores que las respuestas observadas en cualquier grupo a los 14 dpv, pero la variación entre animales significó que esto no alcanzó significación estadística. El análisis de ICS de las respuestas de las células T porcinas mostró un predominio de las citocinas de tipo Th1 (similar a la respuesta murina) pero con una frecuencia más alta de las células T $CD4^+$ específicas de S en comparación con las células T $CD8^+$ (Figura 13D). Sin embargo, las respuestas de citocinas de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ no difirieron significativamente

entre los grupos de vacuna o puntos temporales (14 frente a 42 dpv).

En la Figura 13, se muestran las respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 S después de regímenes de vacunación de sensibilización sola y sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones y cerdos. Se inmunizaron BALB/c consanguíneos (n = 5) y CD1 consanguíneos (n = 8) el día 0 y 28 con ChAdOx1 nCoV19 (Sensibilización-refuerzo) o ChAdOx1 nCoV19 el día 28 (solo sensibilización); Se inmunizaron los cerdos (n = 3) con ChAdOx1 nCoV-19 los días 0 y 28 (Sensibilización-refuerzo), o solo el día 0 (solo sensibilización). Para analizar las respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 S, todos los ratones se sacrificaron el día 49 para el aislamiento de esplenocitos y se tomaron muestras de sangre de los cerdos longitudinalmente para aislar PBMC. Después de la estimulación con péptidos S de SARS-CoV-2, se evaluaron las respuestas de los esplenocitos murinos (**A**) y PBMC porcinas (**C**) mediante ensayos ELISpot de IFN-γ. Usando citometría de flujo, se caracterizaron las respuestas de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ evaluando la expresión de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 (ratones; **B**) e IFN-γ, TNF-α, IL -2 e IL-4 (cerdos; **D**). Cada punto de datos representa un ratón/cerdo individual con barras que indican la respuesta media por grupo/punto de tiempo.

En la Figura 14, se muestran las respuestas de anticuerpo específico de la proteína del SARS-CoV-2 S después de regímenes de vacunación de sensibilización sola y sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 en ratones y cerdos. Se inmunizaron BALB/c consanguíneos (n = 5) y CD1 consanguíneos (n = 8) el día 0 y 28 con ChAdOx1 nCoV19

(Sensibilización-refuerzo) o ChAdOx1 nCoV19 el día 28 (solo sensibilización); mientras que los cerdos se inmunizaron con ChAdOx1 nCoV-19 los días 0 y 28 (Sensibilización-refuerzo), o solo el día 0 (solo sensibilización). Para analizar los anticuerpos específicos de la proteína del SARS-CoV-2 S en suero, se sacrificaron todos los ratones el día 49 y se tomaron muestras de sangre de los cerdos semanalmente hasta el día 42. Se evaluaron las unidades de anticuerpos o los títulos de punto final (EPT) mediante ELISA usando SARS-CoV-2 FL-S recombinante para ratones (**A**) y cerdos (**B**), y proteína S recombinante RBD para cerdos (**C**). Los títulos de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 en sueros de cerdo se determinaron mediante VNT, expresado como el recíproco de la dilución de suero que neutralizó la infectividad del virus en el 50% de los pocillos (ND50; **D**), y pVNT, expresado como dilución recíproca del suero para inhibir entrada de pseudovirus en el 50% (CI_{50}; **E**). Cada punto de datos representa un suero de ratón/cerdo individual con barras que indican la mediana del título por grupo.

Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos de la proteína SARS-CoV-2 S en suero mediante ELISA usando proteínas triméricas solubles recombinantes S (FL-S) y dominio de unión al receptor (RBD). Se observó un aumento significativo en los títulos de anticuerpos de unión a FL-S en ratones BALB/c de sensibilización-refuerzo en comparación con sus contrapartes de solo sensibilización ($p < 0.01$), sin embargo, la diferencia entre los grupos de vacuna para ratones CD1 no fue significativa (Figura 14A). Las respuestas de los anticuerpos se evaluaron longitudinalmente en sueros de cerdo mediante ELISA FL-S y

RBD. En comparación con los sueros de pre-vacunación, se detectaron títulos significativos de anticuerpos específicos de FL-S en ambos grupos de sensibilización-refuerzo y de sensibilización-refuerzo de 21 y 14 dpv, respectivamente ($p < 0.01$; Figura 14B). Los títulos de anticuerpos FL-S no difirieron significativamente entre los grupos hasta después del refuerzo, cuando los títulos en los cerdos de sensibilización-refuerzo se volvieron significativamente mayores con un aumento promedio en los títulos de $> 1 \log_{10}$ ($p < 0.0001$). Los títulos de anticuerpos específicos de RBD mostraron un perfil similar con títulos significativos en ambos grupos a partir de 14 dpv ($p < 0.05$) y un aumento significativo adicional en los cerdos de sensibilización-refuerzo a partir de 35 dpv en adelante, que fue mayor que los cerdos de solo sensibilización ($p < 0.0001$; Figura 14C). Se evaluaron las respuestas de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 mediante una prueba de neutralización de virus (VNT; Figura 14D) y una prueba de neutralización basada en pseudovirus (pVNT; Figura 14E). Después de la inmunización de sensibilización, se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 mediante sueros VNT en 14 y 28 dpv de 2/3 de sensibilización-refuerzo y 2/3 de cerdos con solo sensibilización. Dos semanas después del refuerzo (42 dpv), se detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes y aumentaron en todos los cerdos de sensibilización-refuerzo, que fueron significativamente mayores que los puntos de tiempo anteriores y los títulos medidos en el grupo de solo sensibilización ($p < 0.01$). De acuerdo con este análisis, el suero analizado para neutralizar anticuerpos usando el pVNT reveló que los

títulos de anticuerpos en sueros de cerdo de 42 dpv con sensibilización-refuerzo fueron significativamente mayores que en los puntos de tiempo anteriores y en el grupo de solo sensibilización ($p < 0.001$). El análisis estadístico mostró una correlación altamente significativa entre los títulos de pVNT y VNT (correlación de rango de Spearman $r = 0.86$; $p < 0.0001$).

Discusión

En este ejemplo, se ha utilizado un modelo animal tanto pequeño como grande para evaluar la inmunogenicidad de una o dos dosis de un candidato a vacuna COVID-19, ChAdOx1 nCoV-19 (ahora conocido como AZD1222). Los modelos de animales pequeños tienen un éxito variable en la predicción de la eficacia de la vacuna en animales más grandes, pero son un escalón importante para facilitar la priorización de los objetivos de la vacuna. A diferencia, se ha mostrado que los modelos animales más grandes, como los primates porcinos y no humanos, predicen con mayor precisión el resultado de la vacuna en humanos. Los datos de ratones generados en este estudio sugirieron que el perfil de inmunogenicidad estaba en el extremo superior de una curva de respuesta a la dosis, lo que puede haber saturado la respuesta inmune y oscurecido en gran medida nuestra capacidad para determinar las diferencias entre los regímenes de sensibilización solo o de sensibilización-refuerzo. Se ha desarrollado el cerdo como modelo para generar y comprender las respuestas inmunitarias a la vacunación contra la influenza humana y el virus Nipah. La heterogeneidad inherente de un modelo animal grande consanguíneo es más representativa de las respuestas inmunitarias en los seres humanos. El amplio desarrollo de

reactivos para estudiar las respuestas inmunes en cerdos en los últimos años ha ampliado la utilidad y aplicabilidad del cerdo como modelo para estudiar enfermedades infecciosas. Estos datos demuestran la utilidad del cerdo como modelo para una evaluación adicional de la inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19 y otras vacunas COVID-19.

Se ha mostrado aquí que las respuestas de las células T son más altas en los cerdos que recibieron una vacuna de sensibilización-refuerzo en comparación con los de sensibilización solo en el día 42, mientras que la comparación de las respuestas 14 días después de la última inmunización demuestra que el régimen de sensibilización-refuerzo tendió a una respuesta más alta. Además, la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 indujo respuestas robustas de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ tipo Th1 tanto en cerdos como en ratones. Esto tiene implicaciones importantes para el desarrollo de la vacuna COVID-19, ya que se cree que las células T específicas del virus desempeñan un papel importante en la infección por SARS-CoV-2. Si bien no se ha definido una correlación de protección para COVID-19, publicaciones recientes sugieren que los títulos de anticuerpos neutralizantes pueden estar correlacionados con la protección en modelos de exposición del animal. Una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 induce respuestas de anticuerpos, pero aquí se ha demostrado que las respuestas de anticuerpos se mejoran significativamente después de un refuerzo homólogo en una cepa de ratón y en mayor medida en cerdos. De manera importante, se midió un aumento significativo en los títulos medios de anticuerpos neutralizantes en cerdos después de la vacunación de

refuerzo, lo que puede traducirse en una mayor protección en los estudios clínicos.

Métodos

Declaración de Ética

Se realizaron los estudios en ratones y cerdos según la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido de 1986 y con la aprobación del Organismo de Revisión Ética y Bienestar Animal local pertinente (Ratones - Licencia de proyecto P9808B4F1, y cerdos - Licencia de proyecto PP1804248).

Células y virus

Se hicieron crecer las células Vero E6 en DMEM que contenía piruvato de sodio y L-glutamina (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido), FBS al 10% (Gibco, Thermo Fisher, Loughborough, Reino Unido), penicilina/estreptomicina al 0.2% (10,000 U/ml; Gibco) (medio de mantenimiento) a 37°C y CO_2 al 5%. Se hicieron crecer disoluciones madre de England-2 del aislado de SARS-CoV-2 en células Vero E6 usando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.0001 durante 3 días a 37°C en medio de propagación (medio de mantenimiento con el 2% de FBS). Se valoraron las disoluciones madre de SARS-CoV-2 en células Vero E6 usando MEM (Gibco), FCS al 2% (Labtech, Heathfield, Reino Unido), Avicel al 0.8% (FMC BioPolymer, Girvan, Reino Unido) como superposición. Se fijaron los ensayos de placa con formaldehído (VWR, Leighton Buzzard, Reino Unido) y se tiñeron con azul de toluidina al 0.1% (Sigma-Aldrich). Se realizó todo el trabajo con el virus SARS-CoV-2 vivo en los laboratorios ACDP HG3 por personal capacitado. La propagación, purificación y evaluación de los títulos de ChAdOx1 nCoV-19 fueron tal como se describió anteriormente.

Proteínas recombinantes del SARS-CoV-2 y péptidos sintéticos

Se insertó en el vector un ADN sintético que codifica para el dominio de unión al receptor de la proteína de pico (S) (RBD; aminoácidos 330-532) del SARS-CoV-2 (GenBank MN908947), codón optimizado para la expresión en células de mamíferos (Tecnología IDT) pOPINTTGneo que incorpora una etiqueta His6 C-terminal. Se expresó el RBD recombinante de manera transitoria en Expi293™ (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) y se purificó la proteína a partir de sobrenadantes de cultivo por afinidad de metal inmovilizado seguido de una filtración en gel en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4. Un constructo de proteína trimérica soluble S (FL-S) que codifica los residuos 1-1213 con dos conjuntos de mutaciones que estabilizan la proteína en una conformación previa a la fusión (eliminación de un sitio de escisión de furina e introducción de dos residuos de prolina; K983P, V984P) se expresó tal como se describe. Se retuvo el péptido señal viral endógeno en el extremo N-terminal (residuos 1-14), un dominio de pliegue T4 C-terminal incorporado para promover la asociación de monómeros en trímeros para reflejar la proteína viral transmembrana nativa, y una etiqueta His6 C-terminal incluido para la purificación por afinidad a base de níquel. Similar al RBD recombinante, FL-S se expresó de manera transitoria en Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) y se purificó proteína a partir de sobrenadantes de cultivo por afinidad de metal inmovilizado seguido de filtración en gel en solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7.4. Para el análisis de las respuestas de las células T en cerdos, los péptidos de 16 meros superpuestos compensados

por 4 residuos según la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína S completa del aislado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (secuencia de referencia NCBI: NC_045512.2) se diseñaron y se sintetizaron (Mimotopes, Melbourne, Australia) y se reconstituyeron en acetonitrilo estéril al 40% (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3 mg/mL. Se prepararon tres grupos de péptidos sintéticos que representan los residuos 1-331 (Grupo 1), 332-748 (Grupo 2) y 749-1273 (Grupo 3) para su uso para estimular las células T en IFN-γ ELISpot y Ensayos de tinción de citocinas intracelulares (ICS). Para el análisis de las respuestas de las células T en ratones, se diseñaron y sintetizaron péptidos de 15 meros superpuestos compensados por 11 residuos (Mimotopes) y se reconstituyeron en DMSO estéril al 100% (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 mg/ml. Dos grupos de péptidos que abarcan la región S1 (Grupo 1: 1 a 77 y 317-321, Grupo 2: 78-167) y 2 grupos de péptidos que abarcan la región S2 (Grupo 3: 166 a 241, Grupo 4: 242 a 316) se usaron para estimular los esplenocitos para el análisis ELISpot de IFN-γ, y se usaron grupos individuales de S1 (Grupo 1 y Grupo 2) y S2 (Grupo 3 y Grupo 4) para estimular los esplenocitos para ICS.

Ensayos de inmunogenicidad

Ratones: Las hembras consanguíneas BALB/cOlaHsd (BALB/c) (Envigo) y Crl:CD1 (CD1) (Charles River) consanguíneas de al menos 6 semanas de edad se asignaron al azar en grupos de vacunación 'solo sensibilización' o 'sensibilización-refuerzo' (BALB/c n = 5 y CD1 n = 8). Se inmunizaron ratones de refuerzo por vía intramuscular con 10^8 unidades infecciosas (UI) (6.02 x 10^9 partículas de virus; vp) ChAdOx1 nCoV-19 y se reforzaron por vía intramuscular

cuatro semanas después con 1 x 10^8 UI de ChAdOx1 nCoV-19. Los ratones que solo recibieron el refuerzo recibieron una dosis única de 10^8 UI de ChAdOx1 nCoV-19 al mismo tiempo que se reforzaron los ratones con el refuerzo. Se recogieron los bazos y el suero de todos los animales 3 semanas más tarde.

Cerdos: Seis cerdos cruzados Large White-Landrace-Hampshire de 8-10 semanas de edad, destetados, hembras cruzadas de una unidad de cría comercial se asignaron al azar a dos grupos de tratamiento (n = 3): 'Solo sensibilización' y 'Solo refuerzo'. Se inmunizaron ambos grupos el día 0 con 1 x 10^9 UI (5.12 x 10^{10} vp) de ChAdOx1 nCoV-19 en 1 ml de PBS mediante inyección intramuscular (músculo braquiocefálico). Los cerdos de 'sensibilización-refuerzo' recibieron una inmunización de refuerzo idéntica el día 28. Se tomaron muestras de sangre de todos los cerdos semanalmente a los 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 dpv por venopunción de la vena yugular externa: 8 mL/cerdo en tubos vacutainer BD SST (Fisher Scientific) para la recolección de suero y 40 mL/cerdo en tubos vacutainer de heparina BD (Fisher Scientific) para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Detección de anticuerpos específicos para el SARS-CoV-S mediante ELISA

Ratones: Se determinaron los anticuerpos contra la proteína del SARS-CoV-2 FL-S realizando un ELISA estandarizado en suero recogido 3 semanas después de la vacunación de sensibilización o de sensibilización-refuerzo. Se recubrieron las placas MaxiSorp (Nunc) con 100 ng/pocillo de proteína FL-S durante la noche a 4°C, antes de lavarlas en PBS/Tween (0.05% v/v) y bloquearlas con Caseína Blocker

en PBS (Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se incubaron suero positivo estándar (conjunto de suero de ratón con título de punto final alto contra la proteína FL-S), muestras de suero de ratón individuales, negativo y un control interno (diluido en caseína) durante 2 horas a TA. Tras el lavado, se detectaron los anticuerpos unidos mediante adición de IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich), diluida 1/5000 en caseína, durante 1 hora a TA y detección de IgG anti-ratón mediante la adición de sustrato pNPP (Sigma-Aldrich). Se asignó un número arbitrario de unidades ELISA al grupo de referencia y los valores de DO de cada dilución se ajustaron a una curva logística de 4 parámetros usando el software SOFTmax PRO. Se calcularon las unidades de ELISA para cada muestra usando los valores de DO de la muestra y los parámetros de la curva estándar.

Cerdos: Se aisló el suero mediante centrifugación de tubos SST a 1300 × *g* durante 10 minutos a TA y se almacenó a -80°C. Se evaluaron anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 RBD y FL-S en suero tal como se detalló anteriormente con la excepción de las dos etapas siguientes. Se reemplazó el anticuerpo secundario conjugado con IgG HRP de cabra anti-porcina (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1/10,000 en PBS con $Tween_{20}$ al 0.1% y leche desnatada al 1%. Además, después del último lavado, se añadió a cada pocillo 100 µl de TMB (sustrato de micropocillos de peroxidasas del rábano de un componente, BioFX, Cambridge Bioscience, Cambridge, Reino Unido) y se incubaron las placas durante 7 minutos a TA. A continuación, se añadieron 100 µl de reactivo de detención BioFX de 450 nm (Cambridge

Bioscience) para detener la reacción y se leyeron las microplacas a 450 nm. Se calcularon los títulos de anticuerpos del criterio de valoración (media de duplicados) de la siguiente manera: la DO log10 se representó gráficamente frente a la dilución de la muestra log10 y un análisis de regresión de la parte lineal de esta curva permitió calcular el título del criterio de valoración con una DO de dos veces los valores de DO promedio de sueros 0 dpv.

Evaluación de las respuestas de anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2

Se evaluó la capacidad de los sueros de cerdo para neutralizar el SARS-CoV-2 usando ensayos de neutralización de virus y pseudovirus. Para ambos ensayos, se inactivaron los sueros por calor (HI) primero mediante incubación a 56°C durante 2 horas.

Prueba de neutralización del virus (VNT): Comenzando con una dilución 1 en 5, se prepararon diluciones en serie dobles de sueros en placas de fondo redondo de 96 pocillos usando DMEM que contenía FBS al 1% y Antibiótico-Antimicótico (Gibco) al 1% (medio de dilución). Se mezclaron 75 µL de suero de cerdo diluido con 75 µL de medio de dilución que contenía aproximadamente 64 unidades formadoras de placa (ufp) SARS-CoV-2 durante 1 hora a 37°C. Se sembraron células Vero E6 en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10^5 células/ml en medio de mantenimiento un día antes de la experimentación. Se reemplazaron los sobrenadantes del cultivo por 100 µL de DMEM que contenía FCS al 10% y Antibiótico-Antimicótico al 1%, antes de añadir 100 µl de la mezcla virus-suero a las células Vero E6 y se incubaron durante seis días a 37°C. Se

investigó el efecto citopático (CPE) mediante microscopía de campo brillante. Se fijaron las células adicionalmente y se tiñeron tal como se describió anteriormente, y se puntuó CPE. Se sometió a prueba cada dilución de suero de cerdo individual en cuadruplet en la misma placa y no se procesaron sueros/virus del SARS-CoV-2 ni controles de sueros/virus simultáneamente en cada placa en cuadruplet. Se puntuó los pocillos para determinar el efecto citopático y se expresaron los títulos de neutralización como el recíproco de la dilución de suero que bloqueó completamente el CPE en el 50% de los pocillos (ND_{50}). Los investigadores que realizaron los VNT no conocían la identidad de las muestras.

Prueba de neutralización de pseudovirus (pVNT): Se generaron pseudovirus SARS-CoV-2 basados en lentivirales en células HEK293T incubadas a 37°C,CO_2 al 5%. Se sembraron las células a una densidad de 7.5 x 10^5 en placas de 6 pocillos, antes de transfectarlas con plásmidos de la siguiente manera: 500 ng de pico de SARS-CoV-2, 600 ng de p8.91 (que codifica el VIH-1 gag-pol), 600 ng de CSFLW (columna vertebral del lentivirus que expresa un gen indicador de luciferasa de luciérnaga), en Opti-MEM (Gibco) junto con 10 µL de reactivo de transfección PEI (1 µg/mL). También se estableció un control "sin glicoproteína" usando ADN portador (pcDNA3.1) en lugar del plásmido de expresión SARS-CoV-2 S. Al día siguiente, se reemplazó la mezcla de transfección con 3 ml de DMEM con FBS al 10% (DMEM-10%) y se incubó a 37°C. Tanto a las 48 como a las 72 horas posteriores a la transfección, se recolectaron los sobrenadantes que contenían SARS-CoV-2 pseudotipado (SARS-CoV-2 pps), se combinaron y se centrifugaron a 1,300x g

durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se sembraron células HEK293T diana, previamente transfectadas con 500 ng de un plásmido de expresión de ACE2 humano (Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.) A una densidad de 2 × 10^4 en 100 µL de DMEM al 10% en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano un día antes de la recolección de SARS-CoV-2 pps. Al día siguiente, se titularon las pps de SARS-CoV-2 10 veces en las células diana, y el resto se almacenó a -80°C. Para pVNT, se diluyeron los sueros de cerdo 1:20 en medio sin suero y se añadieron 50 µl a una placa de 96 pocillos por cuadriplicado y se titularon 4 veces. Se añadió un volumen fijo titulado de SARS-CoV-2 pps a una dilución equivalente a 10^6 unidades de luciferasa señal en 50 µL de DMEM al 10% y sueros incubados durante 1 hora a 37°C, CO_2 al 5%. Luego se añadieron células diana que expresan ACE2 humano a una densidad de 2 *x* 10^4 en 100 µL y se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% durante 72 horas. Luego se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga con reactivo de luciferasa BrightGlo y un sistema de detección Glomax-Multi⁺ (Promega, Southampton, Reino Unido). Se expresaron los títulos de neutralización de pseudovirus como el recíproco de la dilución de suero que inhibió la expresión de luciferasa en el 50% (CI_{50}).

Evaluación de las respuestas de células T específicas para SARS-CoV-2

Ratones: Se preparó la suspensión de células individuales de bazos de ratón pasando células a través de filtros de células de 70 µm y lisis ACK (Thermo Fisher) antes de la resuspensión en medio completo (αMEM complementado con FCS al 10%, Pen-Estep, L-Glut y 2-mercaptoetanol). Para el

análisis de la producción de IFN-γ mediante el ensayo ELISpot, se estimularon los esplenocitos con grupos de péptidos S a una concentración final de 2 µg/ml en placas de membrana IPVH (Millipore) recubiertas con 5 µg/ml de IFN-γ anti-ratón (clon AN18; Mabtech). Después de 18-20 horas de estimulación, se detectaron las células formadoras de manchas de IFN-γ (SFC) mediante la tinción de membranas con mAb de biotina IFN-γ anti-ratón (1 µg/ml; clon R46A2, Mabtech) seguido de estreptavidina-fosfatasa alcalina (1 µg/ml; µg/mL) y revelado con el kit de sustrato conjugado AP (Bio-Rad). Para el análisis de la producción de citocinas intracelulares, se estimularon las células con grupos de péptidos S de 2 µg/ml, medios o cóctel de estimulación celular (que contiene PMA-Ionomicina, BioLegend), junto con GolgiPlug de 1 µg/ml (BD Biosciences) y 2 µL/ml de CD107a -Alexa647 durante 6 horas en una placa de fondo en U de 96 pocillos, antes de colocar a 4°C durante la noche. Después de la tinción de superficie con CD4-BUV496, CD8-PerCP-Cy5.5, CD62L-BV711, CD127-BV650, CD44-APC-Cy7 y LIVE/DEAD Aqua (Thermo Fisher), se fijaron las células con formalina tamponada neutra al 10% (que contenía paraformaldehído al 4%) y teñido intracelularmente con TNF-α-AF488, IL-2-PE-Cy7, IL-4-BV605, IL-10-PE e IFN-γ-e450 diluido en tampón Perm-Wash (BD Biosciences). Se realizó la adquisición de la muestra en un Fortessa (BD) y se analizaron los datos en FlowJo v9 (TreeStar). Se estableció un umbral de adquisición en un mínimo de 5000 eventos en la puerta $CD3^+$ en vivo. Se identificaron los linfocitos T específicos de antígeno mediante la activación de células LIVE/DEAD negativas, doblete negativo (FSC-H frente a FSC-A), tamaño (FSC-H frente a SSC), $CD3^+$, $CD4^+$ o

$CD8^+$ y citocinas positivas. Las respuestas de citocinas específicas de SARS-CoV-2 S totales se presentan después de restar la respuesta anterior detectada en la muestra de bazo de control estimulada por medio de cada ratón, antes de sumar la frecuencia de las células específicas de S1 y S2.

Cerdos: Se aislaron las PBMC de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad y se criopreservaron en DMSO frío al 10% (Sigma-Aldrich) en HI FBS. Se suspendieron las PBMC resucitadas en medio RPMI 1640, complemento de GlutaMAX, HEPES (Gibco) complementado con HI FBS al 10 % (origen de Nueva Zelanda, Life Science Production, Bedford, RU), Penicilina-Estreptomicina al 1% y 2-mercaptoetanol al 0.1% (50 mM; Gibco) (cRPMI). Para determinar la frecuencia de células productoras de IFN-γ específicas de SARS-CoV-2 S, se realizó un ensayo ELISpot en PBMC de 0, 14, 28 y 42 dpv. Se recubrieron previamente placas multipantalla de 96 pocillos (MAHAS4510; Millipore, Fisher Scientific) con 1 µg/ml de mAb IFN-γ anti-porcino (clon P2G10, BD Biosciences) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de lavar y bloquear con cRPMI, se sembraron las PBMC en placa a 5 x 10^5 células/pocillo en cRPMI en un volumen de 50 µl/pocillo. Se estimularon las PBMC en pocillos por triplicado con los conjuntos de péptidos de SARS-CoV-2 S a una concentración final de 1 µg/ml/péptido. Se utilizó cRPMI solo en pocillos por triplicado como control negativo. Tras 18 horas de incubación a 37 °C con CO_2 al 5%, se desarrollaron las placas tal como se describió anteriormente. Se determinó el número de células secretoras de IFN-γ específicas usando un analizador ImmunoSpot® S6 (Cellular Technology, Cleveland,

EE. UU.). Para cada animal, los datos medios de 'cRPMI solo' se restaron de los datos del grupo de péptidos S 1, 2 y 3 que luego se sumaron y expresaron como el número medio corregido de células secretoras de IFN-γ específicas de antígeno por 1 x 10^6 PBMC. Para evaluar la expresión de citoquinas intracelulares, se suspendieron PBMC de 14 y 42 dpv en cRPMI a una densidad de 2 x 10^7 células/ml y se añadieron a 50 µl/pocillo a placas de fondo redondo de 96 pocillos. Se estimularon las PBMC en pocillos por triplicado con los conjuntos de péptidos de SARS-CoV-2 S (1 µg/ml/péptido). Se usaron células no estimuladas en pocillos por triplicado como control negativo. Después de 14 horas de incubación a 37°C, CO_2 al 5%, se bloqueó la secreción de citocinas mediante la adición 1: 1,000 BD GolgiPlug (BD Biosciences) y se incubaron las células durante 6 horas. Las PBMC se lavaron en PBS y se marcaron la superficie con tinción de viabilidad fijable Zombie NIR (BioLegend), mAb CD4-PerCP-Cy5.5 (clon 74-12-4, BD Bioscience) y mAb CD8β-FITC (clon PPT23, Bio-Rad Antibodies). Después de la fijación (Tampón de Fijación, BioLegend) y permeabilización (Tampón Permeabilization Wash, BioLegend), las células se tiñeron con: MAb IFN-γ-AF647 (clon CC302, Bio-Rad Antibodies, Kidlington, Reino Unido), mAb TNF-α-BV421 (clon Mab11, BioLegend), mAb IL-2 (clon A150D 3F1 2H2, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) y IL-4 BV605 mAb (clon MP4-25D2, BioLegend) seguido de tinción con IgG2a-PE-Cy7 anti-ratón (clon RMG2a-62, BioLegend). Se analizaron las células usando un citómetro de flujo BD LSRFortessa y el software FlowJo X. Las respuestas positivas de citocinas específicas de fondo SARS-CoV-2 S totales se presentan después de restar la

respuesta de detectada en la muestra de PBMC de control estimulada por medio de cada cerdo, antes de sumar la frecuencia de las agrupaciones de péptido S 1 -3 células específicas.

Referencias

1 Zhu, F.-C. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet*, doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3 (2020).

2 van Doremalen, N. *et al.* A single-dose ChAdOx1-vectored vaccine provides complete protection against Nipah Bangladesh and Malaysia in Syrian golden hamsters. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007462, doi:10.1371/journal.pntd.0007462 (2019).

3 Folegatti, P. M. *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. *The Lancet. Infectious diseases*, doi:10.1016/s1473-3099(20)30160-2 (2020).

4 Munster, V. J. *et al.* Protective efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a transgenic human DPP4 mouse model. *NPJ Vaccines* **2**, 28-28, doi:10.1038/s41541-017-0029-1 (2017).

5 van Doremalen, N. *et al.* A single dose of ChAdOx1 MERS provides broad protective immunity against a variety of MERS-CoV strains. *bioRxiv*, 2020.2004.2013.036293, doi:10.1101/2020.04.13.036293 (2020).

6 van Doremalen, N. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *bioRxiv*, 2020.2005.2013.093195, doi:10.1101/2020.05.13.093195 (2020).

7 van Doremalen, N. *et al.* A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques. *Science Advances*, eaba8399, doi:10.1126/sciadv.aba8399 (2020).

8 Suleman, M. *et al.* Antigen encoded by vaccine vectors derived from human adenovirus serotype 5 is preferentially presented to CD8+ T lymphocytes by the CD8α+ dendritic cell subset. *Vaccine* **29**, 5892-5903, doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.071 (2011).

9 Zhang, Y. *et al.* Immunization with an adenovirus-vectored TB vaccine containing Ag85A-Mtb32 effectively alleviates allergic asthma. *J Mol Med (Berl)* **96**, 249-263, doi:10.1007/s00109-017-1614-5 (2018).

10 Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L. & Gerdts, V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in microbiology* **20**, 50-57, doi:10.1016/j.tim.2011.11.002 (2012).

11 Gerdts, V. *et al.* Large Animal Models for Vaccine Development and Testing. *ILAR Journal* **56**, 53-62, doi:10.1093/ilar/ilv009 (2015).

12 Rivera-Hernandez, T. *et al.* The contribution of non-human primate models to the development of human vaccines. *Discov Med* **18**, 313-322 (2014).

13 Holzer, B. *et al.* Comparison of Heterosubtypic Protection in Ferrets and Pigs Induced by a Single-Cycle Influenza Vaccine. *Journal of immunology*

(Baltimore, Md. : 1950) **200**, 4068-4077, doi:10.4049/jimmunol.1800142 (2018).

14 Holzer, B. *et al.* Immunogenicity and Protective Efficacy of Seasonal Human Live Attenuated Cold-Adapted Influenza Virus Vaccine in Pigs. *Front Immunol* **10**, 2625, doi:10.3389/fimmu.2019.02625 (2019).

15 Morgan, S. B. *et al.* Aerosol Delivery of a Candidate Universal Influenza Vaccine Reduces Viral Load in Pigs Challenged with Pandemic H1N1 Virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **196**, 5014-5023, doi:10.4049/jimmunol.1502632 (2016).

16 McLean, R. K. & Graham, S. P. Vaccine Development for Nipah Virus Infection in Pigs. *Front Vet Sci* **6**, 16, doi:10.3389/fvets.2019.00016 (2019).

17 Pedrera, M. *et al.* Bovine Herpesvirus-4-Vectored Delivery of Nipah Virus Glycoproteins Enhances T Cell Immunogenicity in Pigs. *Vaccines (Basel)* **8**, doi:10.3390/vaccines8010115 (2020).

18 Grifoni, A. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.05.015 (2020).

19 Zheng, H. Y. *et al.* Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **17**, 541-543, doi:10.1038/s41423-020-0401-3 (2020).

20 Chen, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* **130**, 2620-2629, doi:10.1172/jci137244 (2020).

21 Xiong, Y. *et al.* Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* **9**, 761-770, doi:10.1080/22221751.2020.1747363 (2020).

22 Braun, J. *et al.* Presence of SARS-CoV-2 reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*, 2020.2004.2017.20061440, doi:10.1101/2020.04.17.20061440 (2020).

23 Chandrashekar, A. *et al.* SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

24 Yu, J. *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, eabc6284, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

25 Amanat, F. *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, doi:10.1038/s41591-020-0913-5 (2020).

Análisis de datos

Se usó GraphPad Prism 8.1.2 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) para el análisis gráfico y estadístico de conjuntos de datos. Se realizó un ANOVA o un modelo de efectos mixtos para comparar las respuestas a lo largo del tiempo y entre los grupos de vacuna en diferentes momentos posteriores a la vacunación, tal como se detalla en los Resultados. Se transformaron los datos del título de anticuerpos neutralizantes logarítmicamente antes del análisis. Se compararon los datos de títulos de anticuerpos neutralizantes generados por los ensayos VNT y pVNT mediante correlación no paramétrica de Spearman. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativo.

Ejemplo 15: Demostración en Seres Humanos

En este ejemplo se ha descrito la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 frente al SARS-CoV-2: un ensayo de control aleatorizado de fase I/II.

Se ha hecho referencia al Ejemplo 1 y al Ejemplo 2 donde se describen tales ensayos; se ha hecho referencia al Ejemplo 4 donde dichos ensayos se describen con más detalle; se ha hecho referencia al Ejemplo 8 donde los esquemas de las pruebas se describen con más detalle.

De manera más importante, se ha hecho referencia específicamente al Ejemplo 11 anterior, que describe con todo detalle el ensayo clínico en humanos que se comenta a continuación. Puede ayudar a entender leer este ejemplo junto con el Ejemplo 11. El lector experto observará que hay una diferencia en el número de voluntarios en la discusión a continuación en comparación con la discusión en el Ejemplo 11. Para todos los demás detalles sustantivos, puede consultarse el Ejemplo 11 según sea necesario.

Antecedentes

Se ha realizado un ensayo controlado aleatorizado simple ciego de fase 1/2 de ChAdOx1 nCoV-19 en comparación con MenACWY, como vacuna de control, en adultos sanos en el Reino Unido.

En este ejemplo, se ha descrito la inmunogenicidad, reactogenicidad, y seguridad de vacunación con $5x10^{10}$ vp de ChAdOx1 nCoV-19 tras 1 mes.

Métodos

Vacuna

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 consiste en el vector de adenovirus de simio de replicación deficiente ChAdOx1, que

contiene la glicoproteína de superficie estructural de longitud completa (proteína de pico) del SARS-CoV-2 (nCoV-19), con una líder secuencia del activador tisular del plasminógeno (tPA). ChAdOx1 nCoV-19 expresa una secuencia codificante de codón optimizado para la proteína de pico a partir del registro a la secuencia del genoma GenBank: MN908947. Se produjo el adenovirus recombinante tal como se describió anteriormente.[9] Se fabricó la vacuna según las Buenas Prácticas de Fabricación actuales por Clinical BioManufacturing Facility (Universidad de Oxford, Oxford, RU).

Se usó una vacuna conjugada antimeningocócica de los grupos A, C, W-135 e Y (MenACWY, Nimenrix, Pfizer, RU) como comparador activo para mantener el cegamiento de los participantes que experimentaron reacciones locales o sistémicas.

Diseño del estudio y participantes

Este es un ensayo controlado aleatorio multicéntrico, ciego, de fase 1/2 en curso. El estudio se está llevando a cabo en 5 centros del RU (Centro de Vacunación Clínica y Medicina Tropical, Universidad de Oxford; University Hospital Southampton NHS Foundation Trust, Southampton; Clinical Research Facility en Imperial College London; St Georges University of London y University Hospital NHS Foundation Trust; y University Hospitals Bristol y Weston NHS Foundation Trust.) Se reclutó a participantes adultos sanos de entre 18-55 años a través de anuncios locales. Se sometieron todos los participantes a una visita de detección en la que se tomaron un historial médico completo y un examen además de análisis de sangre y orina (VIH, serología de hepatitis B y C, hemograma completo, pruebas

de función renal y hepática, y análisis urinario de sangre, proteínas y glucosa. y una prueba de embarazo realizada en mujeres en edad fértil). Los voluntarios con un historial de COVID-19 confirmados por laboratorio, los que tenían un mayor riesgo de exposición al COVID-19 antes de la inscripción y aquellos con un nuevo inicio de fiebre, tos, dificultad para respirar y anosmia/ageusia desde febrero de 2020 se excluyeron del estudio. Los detalles completos de los criterios de elegibilidad se describen en el protocolo del ensayo proporcionado en el material complementario. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes y el ensayo se está llevando a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas. Este estudio fue aprobado en el RU por la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios (referencia 21584/0424/001-0001) y el Comité de Ética de Investigación de South Central Berkshire (referencia 20/SC/0145). El uso de la vacuna fue autorizado por el Comité de Seguridad de Organismos Genéticamente Modificados del Fideicomiso Nacional de Servicios de Salud de los Hospitales de la Universidad de Oxford (número de referencia GM462.20.129).

Aleatorización y Enmascaramiento

Se asignaron al azar los participantes 1:1 para recibir las vacunas ChAdOx1 nCoV-19 a 5×10^{10} partículas virales o MenACWY. El estadístico del estudio generó listas de asignación al azar, usando asignación al azar en bloques estratificada por grupo de estudio y sitio de estudio. Los tamaños de bloque de 2, 4 y 6 se eligieron para alinearse con los tamaños de los grupos de estudio y el número de dosis disponibles por vial, y varió entre los grupos de

estudio. Se realizó la asignación al azar por ordenador con un ocultamiento total de la asignación dentro de la plataforma web segura usada para el estudio eCRF (REDCap 9.5.22 - © 2020 Vanderbilt University). El personal del ensayo que administró la vacuna preparó vacunas fuera de la vista del participante y las jeringas se cubrieron con un material opaco hasta que estuvieron listas para la administración para asegurar el cegamiento de los participantes.

Procedimientos

Ambas vacunas se administraron como una única inyección intramuscular en el deltoides. Se usó un enfoque de inscripción escalonada y se llevaron a cabo revisiones de seguridad provisionales con la Junta de Monitoreo de Seguridad y Datos (DSMB) independiente antes de continuar con las vacunaciones en un mayor número de voluntarios. Los voluntarios se consideraron inscritos en el ensayo en el momento de la vacunación. Se inscribieron diez participantes en un grupo de sensibilización-refuerzo no aleatorio.

A los participantes se les extrajeron muestras de sangre y se realizaron evaluaciones clínicas de seguridad e inmunología el día 0, 28 y también se realizará un seguimiento en los días 184 y 364. Además, los participantes inscritos en el componente de fase 1 del estudio y en el grupo de sensibilización-refuerzo, tuvieron visitas 3, 7, y 14 días después de cada vacunación. Una enmienda posterior al protocolo proporcionó pruebas adicionales de vacunas de refuerzo en un subconjunto de participantes, cuyos resultados aún no están disponibles y no se incluyen en este informe.

Un subgrupo de participantes no aleatorizados recibió 1 g de paracetamol profiláctico antes de la vacunación y se les recomendó continuar con 1 g cada 6 horas durante 24 horas para reducir las reacciones asociadas a la vacuna.

Se observaron los participantes en la clínica durante 1 h después del procedimiento de vacunación y se les pidió que registraran cualquier acontecimiento adverso (AA) usando diarios electrónicos durante el período de seguimiento de 28 días. Reacciones locales esperadas y definidas por el protocolo (dolor en el lugar de la inyección, sensibilidad, calor, enrojecimiento, hinchazón, induración y prurito) y síntomas sistémicos (malestar, mialgia, artralgia, fatiga, náuseas, cefalea, fiebre y fiebre objetiva definida como temperatura oral de 38°C o más) durante 7 días. Se registraron todos los demás eventos durante 28 días y se registran los acontecimientos adversos graves durante todo el período de seguimiento.

Se clasifica la gravedad de los AA con los siguientes criterios: leve (malestar transitorio o leve <48 horas, sin interferencia con la actividad, no se requiere intervención/terapia médica), moderada (limitación leve a moderada en la actividad, puede ser necesaria alguna ayuda; ninguna o requiere intervención/terapia médica mínima), grave (limitación marcada en la actividad, generalmente se requiere algo de asistencia; requiere intervención/terapia médica) y potencialmente mortal (requiere evaluación en urgencias u hospitalización). Los AA no solicitados se revisan para determinar la causalidad por dos médicos cegados a la asignación del grupo, y se informaron los eventos que se consideran posibles, probables o definitivamente relacionados con las vacunas del estudio.

Se clasificaron los AA de laboratorio mediante el uso de tablas de toxicidad específicas del sitio, que se adaptaron de la escala de clasificación de toxicidad de la Administración de Fármacos y Alimentos de EE. UU.

Medidas de inmunogenicidad

Se evaluaron las respuestas humorales a la vacunación usando un ELISA de IgG total contra la proteína de pico trimérica del SARS CoV-2, dos ensayos de neutralización del SARS Cov2 vivo y un ensayo de neutralización de pseudovirus. Los detalles son los siguientes:

ELISA para la detección de sueros IgG total específicos del antígeno SARS-CoV-2

Se determinaron los anticuerpos totales anti-SARS CoV-2 utilizando un ELISA indirecto interno que usa una curva estándar derivada de un conjunto de muestras de plasma convaleciente del SARS-COV-2 en cada placa. En resumen, se recubrieron las placas con 2 µg/ml de glicoproteína de pico del SARS-CoV-2 trimerizada de longitud completa (producida internamente) y se almacenaron a 4°C durante la noche durante al menos 16 h. Después del revestimiento, se lavaron las placas con PBS/Tween al 0.05% y se bloquearon con caseína. Se sembraron las muestras descongeladas diluidas en caseína por triplicado junto con dos controles positivos internos (Controles 1 y 2) para medir la variación de placa a placa. El Control 1 fue una dilución de una muestra de plasma convaleciente y el Control 2 fue un reactivo de investigación para anti-SARS-CoV-2 Ab (código 20/130 proporcionado por el Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos (NIBSC)). Se usó el conjunto estándar en una dilución en serie doble para producir diez puntos estándar a los que se asignaron

unidades ELISA arbitrarias (UE). Se usó IgG antihumana de cabra (específica de cadena γ) conjugada con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y se desarrollaron placas mediante la adición de tampón de sustrato de 4-nitrofenilfosfato en dietanolamina. Se determinaron las UE estandarizados a partir de una sola dilución de cada muestra frente a la curva estándar que se trazó usando el modelo logístico de 4 parámetros (Gen5 v3.09, Biotek). Cada placa de ensayo constaba de muestras y controles sembrados por triplicado, con diez puntos estándar por duplicado y cuatro pocillos en blanco.

Neutralización del virus Marburg SARS-CoV-2:

Se investigó la actividad neutralizante del SARS-CoV-2 de los sueros humanos sobre la base de protocolos previamente publicados para MERS-CoV (PMID: 32325038, 32325037). En resumen, se inactivaron por calor las muestras durante 30 min a 56°C y se diluyeron en serie en placas de 96 pocillos a partir de una dilución de 1:8. Se incubaron las muestras durante 1 h a 37°C junto con 100 dosis infecciosas de cultivo tisular al 50% (TCID50) SARS-CoV-2 (aislado BavPat1/2020, European Virus Archive Global n.° 026V-03883). Efecto citopático (CPE) sobre células VeroE6 (Vero C1008, ATCC, n.° de Cat CRL-1586, RRID: Se analizó CVCL_0574) 4 días tras la infección. Se definió la neutralización como ausencia de CPE en comparación con controles del virus. Para cada prueba, se usó un control positivo (neutralizar el plasma del paciente COVID-19) en duplicado como un estándar de neutralización entre ensayos. (Kreer et al 2020; biorxiv "Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients" d.o.i: 10.1101/2020.06.12.146290v1)

Ensayo de neutralización de pseudotipo de monograma

Se generó una partícula de pseudovirus SARSCoV-2 basada en lentivirus que expresaba una proteína de pico en la superficie. El ensayo PS CoV nAb se basa en metodologías descritas anteriormente que usan pseudoviriones del VIH-1 (Petropoulos et al., AAC 2000, Richman et al, PNAS 2003, Whitcomb et al., 2007). En resumen, se inactivaron las muestras de suero por calor a 56°C durante una hora y se diluyeron 1:40 con suero humano negativo para SARS CoV-2. Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes (Nab) mediante diluciones en serie triples de punto final de muestras de prueba premezcladas mezcladas con 10? unidades de luz relativa (RLU) del virus pseudotipado del SARS-CoV2 incubados a 37°C durante una hora y luego mezclados con 10? Células transfectadas con HEK 293 ACE2 por pocillo. Por separado, también se mezclaron muestras de prueba de virus de control pseudotipados irrelevantes. Se incubaron placas durante 60-80 horas a 37°C y luego se sometieron a ensayo para la expresión de la luciferasa. Los títulos de neutralización se informan como el recíproco de la dilución de suero que confiere el 50% de inhibición (ID50) de la infección por pseudovirus. % de Inhibición = 100% - (((RLU (Vector + Muestra + Diluyente) - RLU (Previo))/(RLU (Vector + Diluyente) - RLU (Previo))) x 100%). En elensayo de SARS CoV-2 nAb se incluyen sueros de control positivo y negativo en cada placa de ensayo de 96 pocillos (1 control positivo, 1 control negativo, 6 especímenes de pacientes).

Prueba de neutralización de reducción de placa de Public Health England.

Se midieron los títulos de virus neutralizantes en muestras de suero inactivadas por calor (56°C durante 30 min). Se diluyó el SARS-CoV-2 a una concentración de 933 ufp/ml (70 ufp/75 µl) y se mezcló 50:50 en FCS/MEM al 1% con diluciones de suero duplicadas de 1:20 a 1: 640 en una placa con fondo en V de 96 pocillos. Se incubó la placa a 37°C en una caja humidificada durante 1 hora para permitir que el anticuerpo de las muestras de suero se una al virus. Se transfirieron las diluciones de virus y suero a los pocillos de una placa de 24 pocillos de ensayo de placa lavada, se dejaron adsorber a 37°C durante una hora y se superpusieron medios de superposición de ensayo de placa con placa. Después de 5 días de incubación a 37°C en caja humificada, se fijaron las placas, se tiñeron y se contaron las placas. Se determinaron los títulos de neutralización medios (ND_{50}) usando la fórmula de Spearman-Karber en relación con los pocillos de control de virus únicamente.

Ensayo de microneutralización de Public Health England.

El principio del MNA es similar al PRNT. Se expusieron monocapas susceptibles de virus (células Vero/E6) en placas de 96 pocillos a la mezcla de suero/virus preparada como para PRNT. Se incubaron las placas en una caja humedecida sellada durante 1 hora antes de retirar el inóculo de virus y reemplazarlo con una capa superpuesta (CMC al 1% p/v en medio completo). Se volvió a sellar la caja y se incubó durante 24 horas antes de fijarla para el formaldehído. Se visualizaron las microplacas usando un anticuerpo SARS-CoV-2 específico para la proteína de pico del SARS-CoV-2 RBD y un conjugado de HRP de conejo, se visualizaron los focos infectados usando sustrato TrueBlue™. Se contaron las microplacas teñidas usando el analizador ImmunoSpot® S6

Ultra-V y se analizaron los recuentos resultantes en el software SoftMax Pro v7.0.

Inmunoensayo multiplexado

Se desarrolló un inmunoensayo multiplexado para medir la respuesta específica de antígeno a la vacuna frente a ChAdOx1 nCoV-19 y/o la infección natural por SARS-CoV-2 (MesoScaleDiscovery, Rockville, MD). Se recubrió una placa SECTOR® de serología SARS-CoV2 personalizada de 10 puntos con Pico de antígenos del SARS-CoV2, N y RBD, producida por Meso Scale Discovery. Se desarrollaron sueros humanos combinados para controles de calidad internos y como reactivos estándar de referencia. Para evaluar IgG anti-pico y anti-RBD, se recubrieron los antígenos sobre las placas de 200 a 400 µg/ml en PBS. Se bloquearon las placas equilibradas con Bloqueador A durante 1 hora y se lavaron 3 veces antes de la adición del estándar de referencia, los controles y las muestras. Después de la incubación durante 2 horas, se lavaron las placas 3 veces y se añadieron anticuerpos de detección IgG (Anti-Hu/IGG conjugado con SULFO-TAG, clon 2A11) a una concentración de 200 µg/ml. Se incubaron placas durante 1 hora, se lavaron 3 veces, y se leyeron en Tampón de Lectura MSD T.

IFNg ELISPOT ex vivo para enumerar las células T específicas de antígeno.

Se realizaron los ensayos ELISpot usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas para determinar las respuestas al antígeno de la vacuna de pico de SARS-CoV-2 en los días 0 (antes de la vacunación), 7 14, 28 y 56, y también en D35 y 42 en los participantes que recibieron dos dosis. Se realizaron los ensayos usando placas Multiscreen IP ELISpot (Merck Millipore, Watford,

RU) recubiertas con anticuerpo anti-IFN-γ humano 10 µg/ml y se desarrollaron usando kits de conjugado de anticuerpos SA-ALP (Mabtech, Estocolmo, Suecia) y BCIP NBT-plus sustrato cromogénico (Moss Inc., Pasadena, MA, EE. UU.). Se separaron las PBMC de la sangre completa con heparina de litio mediante centrifugación por densidad en las cuatro horas siguientes a la punción venosa. Se incubaron las células durante 18-20 horas en RPMI (Sigma) que contenía 1000 unidades/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomicina y suero de ternero fetal filtrado estéril e inactivado por calor al 10%, previamente analizado para detectar baja reactividad (Labtech International, East Sussex, RU) con una concentración final de 10 µg/ml de péptido combinado. Se usaron un total de 253 péptidos sintéticos (15 meros superpuestos por 10 aminoácidos) que abarcan todo el inserto de la vacuna, incluyendo la secuencia líder del tPA, para estimular las PBMC (Pro-Immune, Oxford, RU). Se agruparon los péptidos en 12 grupos para la proteína de pico del SARS-CoV-2 que contenía de 18 a 24 péptidos, más un grupo único de 5 péptidos para el líder de tPA. Se resumen las secuencias de péptidos y la combinación en la Tabla complementaria S4. Se sometieron a prueba los péptidos por triplicado, con 2.5 x 10^5 PBMC añadidos a cada pocillo de la placa ELISpot en un volumen final de 100 µl. Se expresan los resultados como células formadoras de puntos (SFC) por millón de PBMC, calculados restando la respuesta de control negativa media de la media de la respuesta de cada grupo de péptidos y luego sumando la respuesta para los 13 grupos de péptidos. Se combinaron la enterotoxina estafilocócica B (0.02 µg/mL) y la fitohemaglutinina-L (10 µg/mL) y usaron como control

positivo. Se contaron las placas usando un contador ELISpot automático AID (AID Diagnostika GmbH, algoritmo C, Strassberg, Alemania) usando configuraciones idénticas para todas las placas, y se ajustaron los recuentos solo para eliminar los artefactos. Se aplicó un procedimiento de control de calidad en el que se excluyeron las placas si las respuestas eran> 80 SFC/millón de PBMC en el control negativo (PBMC sin antígeno) o <800 SFC/millón de PBMC en los pocillos del control positivo. Las respuestas con respecto al control negativo fueron bajas, con una mediana de XX SFC (rango intercuartílico (IQR) XX–XX).

Resultados

Los objetivos coprimarios son evaluar la eficacia contra la enfermedad COVID-19 sintomática confirmada virológicamente y la aparición de acontecimientos adversos graves. Los resultados secundarios incluyen perfiles de seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19, y eficacia contra la enfermedad COVID-19 asistida en el hospital, muerte y seroconversión contra proteínas sin picos. Se informan aquí los resultados preliminares para los criterios de valoración secundarios: aparición de signos y síntomas de reactogenicidad local y sistémica durante 7 días después de la vacunación; aparición de acontecimientos adversos no solicitados durante 28 días después de la vacunación; cambio del día 0 (nivel inicial) al día 28 para las medidas de seguridad del laboratorio; aparición de acontecimientos adversos graves; inmunogenicidad celular y humoral de ChAdOx1 nCoV-19.

Estudio de sueros convalecientes de pacientes con COVID-19

Se obtuvieron muestras de individuos ≥18 años de edad con infección por SARS-CoV-2 positiva por PCR de cohortes de

pacientes ingresados en el hospital o en vigilancia de los trabajadores de la salud. (Enfermedad gastrointestinal en Oxford: subestudio COVID [Sheffield REC, referencia: 16/YH/0247], ISARIC/WHO Clinical Characterisation Protocol for Severe Emerging Infections [Oxford REC C, referencia 13/SC/0149], Sepsis Immunomics project [Oxford REC C, referencia:19/SC/0296])

Análisis estadísticos

Los criterios de valoración de seguridad se describen como frecuencias y porcentajes con intervalos de confianza (IC) exactos binomiales del 95%. Las medianas y los rangos intercuartílicos se presentan para los criterios de valoración inmunológicos y los análisis se consideran meramente descriptivos ya que el conjunto completo de muestras aún no se ha analizado en todas las plataformas y, por lo tanto, los resultados que se informan aquí son preliminares.

Se realizaron los análisis estadísticos usando SAS versión 9.4 y R versión 3.6.1 o posterior.

Se determinó el tamaño de la muestra para el estudio por la cantidad de dosis de vacuna que estaban disponibles para su uso después del proceso de fabricación clínica inicial. Los tamaños de las muestras para la eficacia se basan en el número de eventos de resultado primario que se acumulan y se presentan en el protocolo adjunto como un archivo complementario. No se han realizado análisis de eficacia y no se incluyen en este informe.

Una Junta de Monitoreo de Seguridad y Datos independiente proporcionó supervisión de seguridad (véase el archivo complementario).

Se registra este estudio con ClinicalTrials.gov, NCT04324606 y con ISRCTN, número 15281137

Estudio

Entre el 23 de abril y el 21 de mayo de 2020, se inscribieron 1077 participantes en el estudio y se vacunaron con la vacuna de control ChAdOx1 nCoV-19 o MenACWY. (Figura 22).

La mediana de edad de los participantes fue de 35 años (IQR 28, 44 años), el 50% de los participantes eran mujeres y el 91% de los participantes eran de raza blanca (véase la Tabla a continuación). Las características iniciales eran similares entre los grupos aleatorizados (véase la Tabla a continuación).

Tabla : Características iniciales de los participantes asignados al azar

	ChAdOx1 N = 543	**MenACWY N = 534**
Sexo femenino (n %)	265 (49%)	271 (51%)
Edad, años, mediana [IQR]	34 [28, 43]	36 [28, 45]
No fumador	495 (91%)	485 (91%)
Abstemio	89 (16%)	60 (11%)
IMC, mediana [IQR]	24 [22, 27]	24 [22, 27]
Etnia		
Árabe	2 (<1%)	2 (<1%)
Negra	4 (1%)	2 (<1%)
E. Asiático	5 (1%)	4 (1%)
S. Asiático	15 (3%)	20 (4%)
Mezclada	12 (2%)	9 (2%)
Otra	11 (2%)	10 (2%)
No dado	1 (<1%)	1 (<1%)

	ChAdOx1 N = 543	**MenACWY N = 534**
Blanca	493 (91%)	486 (91%)

En aquellos que no recibieron paracetamol profiláctico, el 67% de los participantes de ChAdOx1 nCoV-19 y el 38% de los participantes de MenACWY informaron dolor después de la vacunación, que en su mayoría fue de intensidad leve a moderada. Con paracetamol profiláctico, el dolor se redujo al 50% en los participantes de ChAdOx1 nCoV-19 y al 32% de los participantes de MenACWY. El 83% de los participantes con ChAdOx1 nCoV-19 sin paracetamol y el 77% con paracetamol informaron sensibilidad de intensidad mayormente leve, y el 58% sin paracetamol y el 46% con paracetamol de los receptores de MenACWY. (Figura 15, Tabla S2 a continuación)

Tabla S2 Reacciones adversas locales y sistémicas solicitadas, con y sin paracetamol profiláctico por diario electrónico

Síntoma	**Grupo de Vacuna**	**Paracetamol**	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**
Dolor	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	28 (50%, 36%-64%)	22 (39%, 26%-53%)	5 (9%, 3%-20%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	159 (33%, 28%-37%)	258 (53%, 48%-57%)	66 (14%, 11%-17%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	39 (68%, 55%-80%)	15 (26%, 16%-40%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	296 (62%, 58%-67%)	160 (34%, 29%-38%)	18 (4%, 2%-6%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Enrojecimiento	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	55 (98%, 90%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	472 (97%, 95%-98%)	8 (2%, 1%-3%)	6 (1%, 0%-3%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	56 (98%, 91%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

		Sin Paracetamol	465 (98%, 96%-99%)	4 (1%, 0%-2%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Calor	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	45 (80%, 68%-90%)	10 (18%, 9%-30%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	365 (75%, 71%-79%)	121 (25%, 21%-29%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	47 (82%, 70%-91%)	10 (18%, 9%-30%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	376 (79%, 75%-83%)	96 (20%, 17%-24%)	3 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Comezón	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	49 (88%, 76%-95%)	6 (11%, 4%-22%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	452 (93%, 90%-95%)	35 (7%, 5%-10%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	55 (96%, 88%-100%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	450 (95%, 92%-97%)	23 (5%, 3%-7%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Hinchazón	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	55 (98%, 90%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	466 (96%, 93%-97%)	10 (2%, 1%-4%)	10 (2%, 1%-4%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	53 (93%, 83%-98%)	3 (5%, 1%-15%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	461 (97%, 95%-98%)	8 (2%, 1%-3%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Induración	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	56 (100%, 94%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	470 (97%, 94%-98%)	13 (3%, 1%-5%)	3 (1%, 0%-2%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	54 (95%, 85%-99%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	466 (98%, 96%-99%)	7 (1%, 1%-3%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Sensibilidad	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	13 (23%, 13%-36%)	38 (68%, 54%-80%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

		Sin Paracetamol	84 (17%, 14%-21%)	333 (68%, 64%-72%)	66 (14%, 11%-17%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	31 (54%, 41%-68%)	26 (46%, 32%-59%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	201 (42%, 38%-47%)	256 (54%, 49%-58%)	17 (4%, 2%-6%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Febrilidad	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	36 (64%, 50%-77%)	8 (14%, 6%-26%)	12 (21%, 12%-34%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	237 (49%, 44%-53%)	99 (20%, 17%-24%)	111 (23%, 19%-27%)	40 (8%, 6%-11%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	52 (91%, 81%-97%)	5 (9%, 3%-19%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	437 (92%, 89%-94%)	36 (8%, 5%-10%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Fiebre ≥ 38°C	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	47 (84%, 72%-92%)	6 (11%, 4%-22%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	400 (82%, 78%-85%)	46 (9%, 7%-12%)	33 (7%, 5%-9%)	8 (2%, 1%-3%)	0 (0%, 0%-1%)

	MenACWY	Paracetamol	57 (100%, 94%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	473 (100%, 98%-100%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Escalofríos	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	41 (73%, 60%-84%)	10 (18%, 9%-30%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	215 (44%, 40%-49%)	121 (25%, 21%-29%)	112 (23%, 19%-27%)	39 (8%, 6%-11%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	52 (91%, 81%-97%)	5 (9%, 3%-19%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	429 (90%, 87%-93%)	42 (9%, 6%-12%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Dolor en las articulaciones	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	40 (71%, 58%-83%)	12 (21%, 12%-34%)	4 (7%, 2%-17%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	337 (69%, 65%-73%)	97 (20%, 16%-24%)	47 (10%, 7%-13%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)

	MenACWY	Paracetamol	51 (89%, 78%-96%)	4 (7%, 2%-17%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	429 (90%, 87%-93%)	37 (8%, 6%-11%)	8 (2%, 1%-3%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Dolor muscular	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	29 (52%, 38%-65%)	14 (25%, 14%-38%)	13 (23%, 13%-36%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	193 (40%, 35%-44%)	168 (34%, 30%-39%)	107 (22%, 18%-26%)	19 (4%, 2%-6%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	42 (74%, 60%-84%)	14 (25%, 14%-38%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	358 (75%, 71%-79%)	104 (22%, 18%-26%)	13 (3%, 1%-5%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Fatiga	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	16 (29%, 17%-42%)	23 (41%, 28%-55%)	14 (25%, 14%-38%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	147 (30%, 26%-34%)	176 (36%, 32%-41%)	134 (28%, 24%-32%)	30 (6%, 4%-9%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	31 (54%, 41%-68%)	19 (33%, 21%-47%)	7 (12%, 5%-24%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

		Sin Paracetamol	249 (52%, 48%-57%)	169 (36%, 31%-40%)	56 (12%, 9%-15%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Cefalea	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	22 (39%, 26%-53%)	25 (45%, 31%-59%)	8 (14%, 6%-26%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	156 (32%, 28%-36%)	168 (34%, 30%-39%)	136 (28%, 24%-32%)	27 (6%, 4%-8%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	36 (63%, 49%-76%)	18 (32%, 20%-45%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	280 (59%, 54%-63%)	166 (35%, 31%-39%)	26 (5%, 4%-8%)	3 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
Malestar	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	29 (52%, 38%-65%)	11 (20%, 10%-32%)	14 (25%, 14%-38%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	191 (39%, 35%-44%)	136 (28%, 24%-32%)	124 (25%, 22%-30%)	36 (7%, 5%-10%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	51 (89%, 78%-96%)	5 (9%, 3%-19%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	393 (83%, 79%-86%)	70 (15%, 12%-18%)	11 (2%, 1%-4%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Náuseas	ChAdOx1 nCoV-19	Paracetamol	37 (66%, 52%-78%)	14 (25%, 14%-38%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	363 (75%, 70%-78%)	81 (17%, 13%-20%)	33 (7%, 5%-9%)	10 (2%, 1%-4%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Paracetamol	46 (81%, 68%-90%)	10 (18%, 9%-30%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Sin Paracetamol	427 (90%, 87%-92%)	41 (9%, 6%-12%)	7 (1%, 1%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Tabla S3 Reacciones locales y del sistema solicitadas después de las vacunas de Sensibilización y Refuerzo en los participantes del Grupo 3

	1ª dosis (N=10)					**2ª dosis (N=10)**				
Síntoma	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**
Dolor	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

Síntoma	1ª dosis (N=10)					2ª dosis (N=10)				
	Ninguno	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**
Enrojecimiento	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Calor	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Comezón	9 (90%, 55%-100%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	9 (90%, 55%-100%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Hinchazón	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

Síntoma	1ª dosis (N=10)					2ª dosis (N=10)				
	Ninguno	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**
Induración	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Sensibilidad	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	5 (50%, 19%-81%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Febrilidad	3 (30%, 7%-65%)	2 (20%, 3%-56%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	1 (10%, 0%-45%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Fiebre >= 38 grados	5 (50%, 19%-81%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Escalofríos	2 (20%, 3%-56%)	5 (50%, 19%-81%)	3 (30%, 7%-65%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

Síntoma	1ª dosis (N=10)					2ª dosis (N=10)				
	Ninguno	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**	**Ninguno**	**Leve**	**Moderado**	**Grave**	**Hospitalización**
Dolor en las articulaciones	7 (70%, 35%-93%)	2 (20%, 3%-56%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Dolor muscular	4 (40%, 12%-74%)	4 (40%, 12%-74%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Fatiga	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	6 (60%, 26%-88%)	3 (30%, 7%-65%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Cefalea	3 (30%, 7%-65%)	3 (30%, 7%-65%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	6 (60%, 26%-88%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Malestar	6 (60%, 26%-88%)	0 (0%, 0%-31%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Náuseas	6 (60%, 26%-88%)	1 (10%, 0%-45%)	3 (30%, 7%-65%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

La fatiga y el dolor de cabeza fueron las reacciones sistémicas notificadas con más frecuencia. Se informó fatiga en el 70% y el 71% (sin paracetamol, paracetamol) de los participantes con ChAdOx1 nCoV-19 y en el 48% y el 46% (sin paracetamol, paracetamol) de los que recibieron MenACWY, mientras que los dolores de cabeza se presentaron en el 68% y el 61% (sin paracetamol, paracetamol) de los participantes de ChAdOx1 nCoV-19 y el 41% el 37% (sin paracetamol, paracetamol) de receptores de MenACWY. Otras reacciones adversas sistémicas fueron comunes en el grupo de ChAdOx1 nCoV-19: dolor muscular el 60%, el 48% (sin paracetamol, paracetamol) malestar el 61% el 48% (sin paracetamol, paracetamol); escalofríos el 56%, el 37% (sin paracetamol, paracetamol); y sensación de fiebre el 51%, el 36% (sin paracetamol, paracetamol). El 18% y el 16% de los participantes de ChAdOx1 nCoV-19 (sin paracetamol, paracetamol) informaron una temperatura ≥ 38°C, y el 2% tenía una temperatura ≥ 39°C sin paracetamol. En comparación, <0.5% de los que recibieron MenACWY informaron fiebre ≥ 38°C, y ninguno de los que recibieron paracetamol profiláctico. (Figura 15, Tabla S2).

La gravedad y la intensidad de las reacciones locales y sistémicas fueron más altas el día 1 del estudio (Figura 15).

El análisis ajustado del efecto del paracetamol profiláctico sobre las reacciones adversas de cualquier gravedad en los primeros 2 días después de la vacunación después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 mostró reducciones significativas en el dolor, sensación de fiebre, escalofríos, dolor muscular, dolor de cabeza y malestar general (Figuras 23 y 24).

Diez personas recibieron una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 y se midieron las reacciones locales y sistémicas solicitadas durante 7 días tanto después de la dosis de sensibilización como la dosis de refuerzo. El perfil de reactogenicidad después de la segunda dosis pareció menos grave en este subconjunto, aunque el número de participantes fue pequeño en este grupo, lo que dio lugar a amplios intervalos de confianza (Figura 16, Tabla S3).

Los acontecimientos adversos no solicitados en los 28 días posteriores a la vacunación que se consideraron posible, probable o definitivamente relacionados con ChAdOx1 nCoV-19 fueron predominantemente de naturaleza leve y moderada y se resolvieron durante el período de seguimiento. Los acontecimientos adversos de laboratorio considerados al menos posiblemente relacionados con la intervención del estudio se autolimitaron y predominantemente de gravedad leve o moderada (véase la tabla). Se observaron cambios hematológicos transitorios desde el inicio (leucopenia, linfopenia, neutropenia y trombocitopenia) en un % de participantes en el brazo de ChAdOx1 nCoV-19, en comparación con un % que recibió MenACWY.

Hubo un acontecimiento adverso grave consistente en un nuevo diagnóstico de anemia hemolítica, que se produjo 9 días después de la vacunación. El participante estuvo clínicamente bien en todo momento. El acontecimiento se informó como un SUSAR relacionado con la vacuna MenACWY.

En el grupo de ChAdOx1 nCoV-19, los anticuerpos frente a la proteína pico del SARS-CoV-2 alcanzaron su punto máximo el día 28 (mediana 157, IQR 96, 317) y permanecieron elevados hasta el día 56 (mediana 119, IQR 70, 203) en 43 participantes que recibieron solo una dosis, y aumentó a

una mediana de 639 (IQR 360, 792) en 10 participantes que recibieron una dosis de refuerzo (Figura 17).

Se observaron aumentos similares en las respuestas de anticuerpos tanto a la proteína de pico como al dominio de unión al receptor el día 28 y después de una dosis de refuerzo cuando se midieron en un ensayo multiplex (Figura 18).

Las respuestas de IFN-gamma ELISpot frente a proteína de pico del SARS-CoV-2 a un máximo de 856 células formadoras de puntos por millón de PBMC (SFC) el día 14 (IQR 493.3-1802 SFC], disminuyendo a 424 (IQR 221, 799) el día 56 después de la vacunación (Figura 19).

Después de una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19, el 27% de los participantes tenían niveles de anticuerpos suficientes para inducir la inhibición completa de la entrada de células virales el día 28, aumentando al 38% de los participantes el día 56, en un ensayo de neutralización del virus SARS-CoV-2 midiendo IC100 (Marburg). Después de una dosis de refuerzo, los títulos virales indujeron la inhibición completa del virus SARS-CoV-2 en todos los participantes (paneles superiores de la Figura 21).

En dos ensayos independientes de neutralización de virus vivos realizados en Public Health England, el 100% de los participantes alcanzaron títulos de PRNT50 el día 28, y se obtuvieron resultados similares mediante microneutralización (paneles inferiores de la Figura 21).

Se correlacionaron los títulos del ensayo de neutralización de pseudovirus con los títulos del ensayo de neutralización de virus vivos y ELISA.

Discusión del Ejemplo 15

Los hallazgos muestran que la vacuna candidata ChAdOx1 nCoV-19 administrada como dosis única fue tolerada de manera segura, a pesar de un perfil de reactogenicidad mayor que la vacuna de control, MenACWY. No se produjeron reacciones adversas graves a ChAdOx1 nCoV-19. La mayoría de los AA notificados fueron de gravedad leve o moderada, y todos fueron autolimitativos. El perfil de acontecimientos adversos notificados aquí es similar al de otras vacunas vectorizadas ChAdOx1 y otros adenovirus de simio estrechamente relacionados, como las vacunas vectorizadas ChAdOx2, ChAd3 y ChAd63 que expresan múltiples antígenos diferentes (ChAdOx1, Folegatti 2020 ChAdOx2, Vaccines 2019, 7, 40; doi:10.3390/vaccines7020040 ChAd63, doi: 10.1038/s41598-018-21630-4 ChAd3, doi: 10.1056/NEJMoa1411627) a este nivel de dosis. Se eligió una dosis de $5x10^{10}$ vp basándose en la experiencia previa con ChAdOx1 MERS, donde a pesar del aumento de la reactogenicidad, se observó una relación dosis-respuesta con anticuerpos neutralizantes.[7] Se redactó el protocolo cuando la pandemia se estaba acelerando en el RU y se eligió una dosis única más alta para proporcionar la mayor posibilidad de inducción rápida de anticuerpos neutralizantes. En el contexto de una ola pandémica en la que es más probable que una sola dosis más alta, pero más reactogénica, induzca rápidamente una inmunidad protectora, el uso de paracetamol profiláctico parece aumentar la tolerabilidad y reduciría la confusión con los síntomas de COVID19 que podrían ser causados por síntomas relacionados con la vacuna de corta duración.

Se ha demostrado que una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 provoca anticuerpos específicos de picos en el día 14 en el

64% de los vacunados, lo que fue evidente en el 95% de los vacunados en el día 28. Un pequeño número (3%) de los participantes tenía anticuerpos detectables frente a una proteína de pico del SARS-CoV-2 antes de la vacunación. Es probable que estas respuestas preexistentes se deban a una infección asintomática, ya que los posibles participantes con síntomas recientes similares al COVID-19 o una prueba de PCR positiva para el SARS-CoV-2 se excluyeron del estudio. De los tres individuos seropositivos el día de la vacunación en el ELISA interno, dos recibieron ChAdOx1 nCoV-19 y montaron una respuesta de refuerzo.

Los anticuerpos neutralizantes que se dirigen a diferentes epítopos de la glicoproteína de pico y se han asociado con la protección contra la enfermedad COVID en estudios preclínicos tempranos de rhesus macque (Barouch). Si bien no se ha definido una correlación de protección para COVID-19, se han demostrado altos niveles de anticuerpos neutralizantes en individuos convalecientes, con un amplio rango, como se confirma en ese estudio. Se detectaron anticuerpos neutralizantes frente al virus SARS-CoV-2 vivo en el 27% y el 100% de los participantes el día 28 (IC100 e IC50 respectivamente), usando diferentes ensayos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes y las tasas de seroconversión aumentaron con un régimen de dos dosis, y se está investigando más a fondo este enfoque. La correlación de los ensayos de neutralización con la cuantificación de IgG indica que, si se confirma, un simple ELISA puede ser suficiente para predecir la protección, si se demuestra que el anticuerpo neutralizante es protector en humanos. Se han presentado datos de 3 ensayos de anticuerpos neutralizantes vivos diferentes y un ensayo de pseudo-neutralización, que

muestran una estrecha correlación entre sí pero dan títulos de anticuerpos neutralizantes muy diferentes. Este problema destaca la necesidad urgente de una infraestructura de laboratorio centralizada para permitir un puente entre las vacunas candidatas y acelerar la disponibilidad de múltiples productos para proporcionar la capacidad global para poner fin a la pandemia. Si algún candidato demuestra eficacia, vincular este resultado con otras vacunas candidatas a través de ensayos de laboratorio rigurosamente realizados se convertirá en un problema crítico para la salud mundial.

Es importante destacar que en los pacientes con COVID se están acumulando datos que sugieren que las respuestas de las células T desempeñan un papel importante en la mitigación de la enfermedad por COVID-19; los individuos que estuvieron expuestos pero asintomáticos desarrollaron una sólida respuesta de células T de memoria que prevenía la enfermedad en ausencia de una respuesta humoral mensurable. [10-12] La vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 produjo aumentos significativos en las respuestas de células T específicas del pico de CoV-2 del SARS ya en el día 7, alcanzando su punto máximo en el día 14 y se mantuvo hasta el día 28 y fue ? por vacunación de refuerzo.

Los casos graves y mortales de SARS CoV-2 afectan de manera desproporcionada a las personas mayores. Por tanto, es de suma importancia que las vacunas desarrolladas frente a SARS CoV-2 sean adecuadas para su administración en grupos de mayor edad. Se ha demostrado la inmunogenicidad de una vacuna vectorizada ChAdOx1 contra la influenza en adultos mayores (50-78 años). En la siguiente etapa del desarrollo clínico, se reclutará a adultos mayores y se evaluará la

seguridad e inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19 para administrarlo como un régimen de administración de una o dos dosis. Además, los ensayos de fase III, que están en curso en el RU, Brasil y Sudáfrica, evaluarán la eficacia de la vacuna.

Las limitaciones de este estudio incluyen el seguimiento corto y el diseño simple ciego. Los participantes reclutados en este estudio serán objeto de seguimiento durante al menos 1 año y se informarán más resultados de seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad (además de la eficacia) cuando haya datos disponibles (Weingartl, H. et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. J Virol 78, 12672-12676, doi:10.1128/JVI.78.22.12672-12676.2004 (2004). Bolles, M. et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. J Virol 85, 12201-12215, doi:10.1128/JVI.06048-11 (2011). Liu, L., et al., Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. JCI Insight 4, doi:10.1172/jci.insight.123158 (2019).).

En conclusión, ChAdOx1 nCoV-19 fue seguro, tolerado e inmunogénico, la reactogenicidad se redujo con paracetamol. Una dosis única provocó respuestas tanto humorales como celulares contra el SARS-CoV-2, con una inmunización de refuerzo que aumentó los títulos de anticuerpos neutralizantes. Los resultados preliminares de este primer ensayo clínico en humanos respaldan la progresión del

desarrollo clínico en ensayos de fase 2 y 3. Se reclutarán los grupos de mayor edad con comorbilidades, los trabajadores de la salud y aquellos con mayor riesgo de exposición al SARS-CoV-2 y se evaluarán para determinar la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19 para administrarse como un régimen de administración de dosis única o dos ensayos adicionales realizados en el RU y en el extranjero.

También se ha hecho referencia a la Figura 25 que muestra la neutralización del pseudotipo (IC50) en receptores de ChAdOx1 nCoV-19 se correlaciona con ELISA estandarizado y con la neutralización de virus vivo medida por IC100 (Marburg).

También se ha hecho referencia a la siguiente tabla: Resumen de estadísticas para ensayos de anticuerpos y respuestas de células T.

Ensayo	Día del Estudio		MenACWY		ChAdOx1 de Sensibilización		ChAdOx1 Sensibilización -Refuerzo
		N	Mediana [IQR]	N	Mediana [IQR]	N	Mediana [IQR]
MSD multiplex - RBD IgG (AU/mL)	0	487	15.6 [10.1, 32.7]	488	18.5 [10.9, 38.8]		
	28	485	15.8 [10.2, 32.4]	482	3182.5 [1426.3, 6800.4]		
	42					9	16825.4 [13118.9, 20937.9]
MSD multiplex – IgG anti-pico (AU/mL)	0	487	45.5 [26.1, 98.2]	488	57.6 [29.1, 125.8]		
	28	485	43.9 [23.9, 94.5]	482	10471.8 [5378.6, 20517.3]		
	42					9	33830.8 [25674.3, 52251.8]
IgG anti-pico usando	0	131	1 [1, 1]	129	1 [1, 1]	10	1 [1, 2.3]
	7	44	1 [1, 1]	42	1 [1, 1.8]	10	1 [1, 2.4]
	14	44	1 [1, 1]	44	102.7 [43.7, 186]	10	137 [46.4, 206.8]

ELISA estandarizado (UE/mL)	28	130	1 [1, 1]	127	157.1 [96.2, 316.9]	10	210.7 [149.4, 321.6]
	35					10	821.1 [578.1, 1298.4]
	42					9	997.5 [648.5, 1214]
	56	44	1 [1, 2.6]	43	119 [70.3, 203.4]	10	639.2 [360, 792.2]
Respuesta de IFN-γ ELISpot contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 (células formadoras de puntos por millón de PBMC)	0	73	64 [48, 132]	71	60 [48, 114]	10	108 [90.8, 150.2]
	7	43	67.3 [48, 113]	40	183.2 [79.5, 345]	10	258 [209.8, 432.2]
	14	44	55.3 [48, 99.3]	43	856 [493.3, 1802]	10	1642.3 [1423.7, 2009.5]
	28	69	61.3 [48, 88]	68	554.3 [311.3, 1017.7]	10	528.7 [376.3, 603]
	56	42	66.7 [48, 123.3]	43	424 [221.3, 798.7]	10	614 [437.3, 666]

Compendio

Se ha realizado un ensayo controlado aleatorizado simple ciego de fase I/II para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de una vacuna de vector viral de adenovirus de chimpancé (ChAdOx1) que expresa la proteína de pico del SARS-CoV-2, a una dosis de $5x10^{10}$ partículas virales, en adultos sanos de 18-55 años en comparación con una vacuna antimeningocócica conjugada (MenACWY) como control. Un subconjunto de voluntarios no aleatorizados recibió un programa de dos dosis. Se ha evaluado la seguridad y las respuestas inmunes celular y humoral. Se registró el estudio en ISRCTN número 15281137 y ClinicalTrials.gov, NCT04324606.

Hallazgos

Entre el 23 de abril de 2020 y el 21 de mayo, se asignaron al azar 1077 voluntarios 1:1 para recibir las vacunas ChAdOx1 nCoV-19 o MenACWY. Las reacciones locales fueron más comunes en el grupo de ChAdOx1 nCoV-19, incluyendo el dolor (67%) y la sensibilidad (83%) en el lugar de la inyección. Se notificaron las reacciones sistémicas que incluyen dolor de cabeza (68%), fatiga (70%), escalofríos (56%), fiebre (51%), malestar (61%) y dolor muscular (60%) con frecuencia, pero se redujeron con el uso de profilaxis. paracetamol, y menores después de una segunda dosis. No hubo acontecimientos adversos graves relacionados con ChAdOx1 nCoV-19. Las respuestas de las células T de proteína de pico alcanzaron su punto máximo el día 14. Las respuestas de IgG de proteína anti-pico fueron detectables el día 14 después de la inmunización, y continuaron aumentando hasta el día 28. Se detectaron respuestas de

anticuerpos neutralizantes de coronavirus vivo IC50 en el 100% de los vacunados un mes después de una dosis (38% en el ensayo IC100) y en el 100% después de 2 dosis (100% en el ensayo IC100), y se correlacionaron fuertemente con las respuestas y respuestas de anticuerpos ELISA en un ensayo de neutralización de pseudovirus.

Interpretación

ChAdOx1 nCoV-19 fue tolerable después de la vacunación con reactogenicidad mitigada por el uso de paracetamol profiláctico. Se correlacionó la IgG de la proteína de pico con respuestas de anticuerpos neutralizantes y la inmunogenicidad mejoró después de una segunda dosis.

Valor añadido de este estudio: Este estudio es el primer estudio clínico de ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222). La vacuna fue segura y tolerada, con reactogenicidad reducida cuando se utilizó paracetamol de manera profiláctica durante las primeras 24 horas después de la vacunación. En el pequeño grupo que recibió una segunda dosis, la reactogenicidad se redujo después de la segunda dosis. Se indujeron aumentos de cuatro veces en las respuestas humorales a la proteína de pico del SARS-CoV-2 en el 95% de los participantes el día 28 y se indujeron respuestas celulares en todos los participantes el día 14. Se indujeron anticuerpos neutralizantes en una mayor proporción de participantes después de una segunda dosis de vacuna. Se realizó el estudio en el RU.

Implicaciones de toda la evidencia disponible: Se podría usar una vacuna contra el SARS-CoV-2 para prevenir infecciones, enfermedades y/o muerte en toda la población, con poblaciones de alto riesgo como los trabajadores de hospitales y los adultos mayores priorizados para recibir

la vacuna. Aún no se han determinado los correlatos inmunitarios de la protección contra el SARS-CoV-2. La inmunización con ChAdOx1-nCoV-19 da como resultado una rápida inducción de respuestas inmunes humorales y celulares contra el SARS-CoV-2, con un aumento de las respuestas después de una segunda dosis. Se deben realizar estudios clínicos adicionales, incluyendo adultos mayores, con esta vacuna.

Referencias del Ejemplo 15:

1. Organización Mundial de la Salud Draft Landscape of COVID-19 candidate vaccines. 2020. https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

2. Fidler S, Stohr W, Pace M, et al. Antiretroviral therapy alone versus antiretroviral therapy with a kick and kill approach, on measures of the HIV reservoir in participants with recent HIV infection (the RIVER trial): a phase 2, randomised trial. Lancet 2020; 395(10227): 888-98.

3. Hanke T. Aiming for protective T-cell responses: a focus on the first generation conserved-region HIVconsv vaccines in preventive and therapeutic clinical trials. Expert Rev Vaccines 2019; 18(10): 1029-41.

4. Mothe B, Manzardo C, Sanchez-Bernabeu A, et al. Therapeutic Vaccination Refocuses T-cell Responses Towards Conserved Regions of HIV-1 in Early Treated Individuals (BCN 01 study). EClinicalMedicine 2019; 11: 65-80.

5. Coughlan L, Sridhar S, Payne R, et al. Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults. EBioMedicine 2018; 29: 146-54.

6. van Doremalen N, Haddock E, Feldmann F, et al. A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques. Science Advances 2020; 6(24): eaba8399.
7. Folegatti PM, Bittaye M, Flaxman A, et al. Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. Lancet Infect Dis 2020; 20(7): 816-26.
8. van Doremalen N, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques BioRxiv (under review) 2020.
9. Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, et al. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. PLoS One 2012; 7(7): e40385.
10. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell 2020; 181(7): 1489-501.e15.
11. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. bioRxiv 2020: 2020.06.29.174888.
12. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. Science Immunology 2020; 5(48): eabd2071.

Ejemplo 16: Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 administrada en un régimen de sensibilización-refuerzo en seres humanos adultos mayores (COV002).

El ejemplo 16 se refiere a un ensayo controlado aleatorio simple ciego de fase 2/3, debe leerse junto con los ejemplos anteriores, en particular los ejemplos 11 y 15.

Antecedentes

Los adultos mayores tienen un mayor riesgo de enfermedad grave y una mayor mortalidad si desarrollan COVID-19, por lo que son una prioridad para la inmunización en caso de que se desarrolle una vacuna eficaz. La inmunogenicidad de las vacunas suele ser más deficiente en los adultos mayores como resultado de la inmunosenescencia. Recientemente se ha informado sobre la inmunogenicidad de una nueva vacuna vectorizada viral, ChAdOx1 nCoV-19, en adultos jóvenes, y ahora se ha descrito la seguridad e inmunogenicidad de esta vacuna en adultos mayores.

En ensayos clínicos se han sometido a prueba dos vacunas recombinantes con vectores virales. Una vacuna basada en un vector de dosis única de adenovirus-5 (Ad5) (CanSino Biological/Instituto de Biotecnología de Beijing, China) provocó anticuerpos neutralizantes y respuestas de células T de una manera dependiente de la dosis, pero fue menos inmunogénica en individuos > 55 años de edad. Un programa de vacunación vectorial heteróloga de sensibilización-refuerzo Ad5/Ad26 (Instituto de Investigación Gamaleya, Rusia) generó anticuerpos neutralizantes y respuestas celulares en adultos <60 años.

Compendio

Se aleatorizó a adultos sanos de 18 a 55, 56 a 69 o > 70 años para recibir ChAdOx1 nCoV-19 por vía intramuscular (en una dosis baja o estándar) o una vacuna de control, MenACWY, en un componente de fase II de una vacuna de fase II/III ensayo controlado aleatorio. Los análisis fueron por

asignación grupal en participantes que recibieron vacuna. Aquí, se ha informado de los hallazgos preliminares sobre seguridad, reactogenicidad y respuestas inmunes celulares y humorales. El estudio está en curso y está registrado en Clinicaltrials.gov, NCT 04400838, e ISRCTN, 15281137.
Las reacciones locales y sistémicas fueron más frecuentes en los grupos de ChAdOx1 nCoV-19 que en los grupos de control, y de naturaleza similar a las informadas anteriormente (dolor en el lugar de la inyección, sensación de fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza), pero las experimentaron con menos frecuencia los adultos mayores que adultos más jóvenes. Ocurrieron once acontecimientos adversos graves (AAG) durante el período de estudio, todos los cuales se consideraron no relacionados con las vacunas del estudio. Las respuestas de IgG total y de anticuerpos neutralizantes después de la primera dosis fueron menores en los que recibieron la vacuna de dosis baja y en los adultos mayores, pero las respuestas fueron similares en todos los grupos después de la administración de la dosis de refuerzo. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes fueron mayores en los grupos reforzados en comparación con los grupos sin refuerzo. Las respuestas de las células T alcanzaron su punto máximo el día 14 y fueron similares en todos los grupos de edad.
ChAdOx1 CoV-19 se tolera mejor en adultos mayores que en adultos más jóvenes y tiene una inmunogenicidad similar en todos los grupos de edad después de una dosis de refuerzo. Este estudio es el cuarto ensayo clínico de una vacuna frente a SARS-CoV-2 probado en una población de adultos mayores. La vacuna fue segura y bien tolerada, con reactogenicidad reducida en adultos mayores. Se indujeron

las respuestas de anticuerpos frente a la proteína de pico del SARS-Cov-2 en todos los grupos de edad y se reforzaron y mantuvieron a los 28 días después de la vacunación de refuerzo, incluyendo los del grupo de más de 70 años. También se indujeron respuestas inmunitarias celulares en todas las edades y grupos de dosis, alcanzando el máximo el día 14 después de la vacunación.

La inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 da como resultado el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 en el 100% de los participantes, incluyendo los adultos mayores, con niveles más altos en los grupos reforzados en comparación con los no reforzados.

Introducción

La inmunosenescencia se refiere al declive y deterioro gradual del sistema inmunológico provocado por el envejecimiento. Se cree que las diferencias dependientes de la edad en la funcionalidad y disponibilidad de las poblaciones de células T y B desempeñan un papel clave en la disminución de la respuesta inmune. Se asocia la inmunosenescencia con una mayor susceptibilidad a la infección y una reducción de las respuestas a las vacunas en los adultos mayores y puede contribuir a los malos resultados en este grupo de edad. Ha habido un impulso para desarrollar vacunas y formulaciones adyuvantes diseñadas para adultos mayores para superar esta respuesta inmune disminuida después de la vacunación. Por tanto, la evaluación de las respuestas inmunitarias en los adultos mayores es esencial en el desarrollo de vacunas COVID-19 que podrían proteger a esta población vulnerable.

Los resultados preliminares de un ensayo clínico de fase 1/2 de ChAdOx1 nCov-19 en adultos de 18-55 años muestran

que la vacuna es bien tolerada y genera fuertes respuestas inmunitarias celulares y de anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína de pico (8). A continuación se presentan los resultados de un estudio multicéntrico de fase 2/3 usando ChAdOx1 nCOV-19 en 2 dosis diferentes, en adultos, incluyendo los mayores de 70 años, y en un régimen de 1 o 2 dosis.

Métodos y Procedimientos

En el estudio de Fase I/II anterior, se usó una dosis estándar única de 5×10^{10} vp de ChAdOx nCov-19, según la experiencia previa con un constructo ChAdOx1 MERS (9). En este estudio, se ha evaluado una dosis más baja de $2{\cdot}2 \times 10^{10}$ pv con una dosis estándar de $3{\cdot}5\text{-}6{\cdot}5 \times 10^{10}$ pv en adultos de diferentes cohortes de edad. Debido a la necesidad de producir rápidamente una gran cantidad de dosis de vacuna fabricada con GMP para permitir la inscripción oportuna en el ensayo clínico de Fase II/III, dos lotes diferentes de vacuna: fabricados y puestos en viales por Advent .r.I. (Pomezia, Italia) y fabricado por COBRA Biologics Ltd (Keele, RU) y puesto en viales por Symbiosis, se usaron en este estudio. Se fabricaron ambas según las Buenas Prácticas de Fabricación, tal como se describe en el Dossier de Producto Medicinal en Investigación y aprobado por la agencia reguladora en el RU, la MHRA.

La evaluación de la comparabilidad analítica de los lotes indica que los lotes son comparables.

Se administró ChAdOx1 nCoV-19 como un régimen de dosis única o de dos dosis (con un intervalo de 4-6 semanas) a una dosis baja (LD) de $2{\cdot}2\text{x}10^{10}$ vp o una dosis estándar (SD) de entre $3{\cdot}5$ and $6{\cdot}5 \times 10^{10}$ partículas virales, medidas

por espectroscopia UV (simbiosis) o qPCR (Advent). Se administró como una única inyección intramuscular en el deltoides, según los SOP específicos del estudio. Se proporcionó la vacuna MenACWY por el Departamento de Salud y Asistencia Social del RU y se administró según el resumen de las características del producto a la dosis estándar de 0·5mL:
https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/26514#gref.
Se indicó a los participantes de cada grupo que completaran una tarjeta de diario para registrar y evaluar la gravedad de los acontecimientos adversos. Se pidió a todos los grupos que informaran AA tanto solicitados como no solicitados durante 7 días, y los subgrupos también informaron EA no solicitados durante 28 días completos. Los acontecimientos adversos locales solicitados definidos por el protocolo incluyeron dolor en el lugar de la inyección, sensibilidad, calor, enrojecimiento, hinchazón, induración y picazón, y los acontecimientos adversos sistémicos solicitados incluyeron malestar, dolor muscular, dolor articular, fatiga, náuseas, dolor de cabeza, escalofríos, fiebre (es decir, un sensación autoinformada de tener fiebre) y fiebre objetiva definida como una temperatura oral de 38°C o más.
Se clasificó la gravedad de los acontecimientos adversos con los siguientes criterios: leve (malestar transitorio o leve durante <48 h, sin interferencia con la actividad y no se requiere intervención médica o terapia), moderada (limitación leve a moderada en la actividad y sin o mínima requiere intervención o terapia), severa (limitación marcada en la actividad y requiere intervención o terapia médica) y potencialmente mortal (requiere evaluación en el

departamento de emergencias u hospitalización). Los acontecimientos adversos no solicitados se revisaron para determinar la causalidad por dos médicos cegados a la asignación del grupo, y se informaron los eventos que se consideran posibles, probables o definitivamente relacionados con las vacunas del estudio. Se clasificaron los acontecimientos adversos de laboratorio mediante el uso de tablas de toxicidad específicas del sitio, que se adaptaron de la escala de clasificación de toxicidad de la Administración de Fármacos y Alimentos de EE. UU.
Todos los participantes en los grupos de edad de 56-69 y 70+ y los participantes en los grupos de 18-55 SD/SD tuvieron evaluaciones clínicas y de inmunogenicidad a los 0, 7, 14 y 28 días después de sus vacunas de sensibilización y refuerzo. Los participantes en el grupo de 18-55 LD/LD tuvieron evaluaciones clínicas y de inmunogenicidad a los 0 y 28 días después de sus vacunas de sensibilización y refuerzo.
Se evaluaron las respuestas celulares usando un ensayo de inmunospot unido a enzima de interferón-γ *ex vivo* (ELISpot) para enumerar células T específicas de antígeno. Se evaluaron las respuestas humorales al inicio y después de la vacunación usando un ELISA de IgG total estandarizado contra la proteína de pico CoV-2 del SARS trimérico, un inmunoensayo multiplexado (inmunoensayo multiplexado Meso Scale Discovery [MIA] contra el dominio de unión del receptor y el pico),ensayos de neutralización de SARS-CoV-2 vivo (ensayo de microneutralización de Public Health England [PHE] [MNA IC_{80}]) y un ensayo de neutralización de pseudovirus (Monogram PseudoNA IC_{50}). Se midió el anticuerpo neutralizante del vector ChAdOx1 usando un

ensayo de indicador de fosfatasa alcalina alcalina secretada (SEAP) que mide el recíproco de la dilución de suero requerida para reducir la expresión *in vitro* de SEAP expresada en vector en el 50%, 24 horas después de la transducción.

Análisis estadísticos

Los criterios de valoración de seguridad se describen como frecuencias (%) con IC exactos binomiales del 95%. Las medianas y los IQR se presentan para los criterios de valoración inmunológicos. Se analizaron los participantes según el grupo al que se asignaron al azar. Para evaluar la relación entre las respuestas en diferentes ensayos, se usó la regresión lineal para analizar los valores tras el nivel inicial transformados logarítmicamente. Se realizaron los análisis estadísticos usando SAS versión 9.4 y R versión 3.6.1 o posterior.

Resultados

Las figuras 26 a 31 hacen referencia a y muestran datos relacionados con el Ejemplo 16.

Se han reclutado 9869 participantes para el ensayo COV002 hasta septiembre de 2020. 5079 participantes han sido vacunados con ChAdOx1 nCov-19 y 4790 han recibido MenACWY. De estos, y se informa aquí, 102 se han inscrito en el grupo 18-55 LD (dosis baja)/LD, 60 en el grupo 18-55 SD (dosis estándar)/SD, 80 en el grupo 56-69 LD/LD 80 en el grupo 56-69 SD/SD, 120 en el grupo> 70 LD/LD y 120 en el grupo> 70 SD/SD. Se vacunaron todos los participantes asignados al azar. Las características iniciales de los participantes en cada grupo parecían similares entre las asignaciones de asignación al azar.

El dolor y la sensibilidad en el lugar de la inyección fueron las reacciones adversas locales solicitadas más comunes y ocurrieron con mayor frecuencia en las primeras 48 horas después de la vacunación. Se informó de al menos un síntoma local de leve a moderado después de la vacunación de sensibilización con ChAdOx1 nCOV-19 por el 88.0%, el 73.3% y el 60.0% de los participantes en el grupo 18-55 SD/SD, grupo 56-69 SD/SD y grupo > 70 SD/SD respectivamente. Se informaron proporciones similares de síntomas locales después de la vacunación de refuerzo con ChAdOx1 nCOV-19 con el 75.5%, 72.4% y 55.1% de los participantes en el grupo de 18-55 SD/SD, grupo de 56-69 SD/SD y grupo > 70 SD/SD, respectivamente, que informó al menos un síntoma local leve a moderado. Se observó un patrón similar en todos los grupos de edad para los grupos de edad de LD/LD pero con menos reacciones adversos totales. 56.7%, 40.0% y 28.2% de las personas de 18-55, 56-69 y> 70 años después de la primera vacunación con MenACWY experimentaron síntomas locales de leves a severos y en el 86.4%, el 36.8 % y el 20.0% después de la vacunación de refuerzo con MenACWY respectivamente.

La fatiga, el dolor de cabeza, la fiebre y la mialgia fueron las reacciones adversas sistémicas más solicitadas. Se informó al menos un síntoma sistémico de moderado a grave después de la vacunación de sensibilización con ChAdOx1 nCOV-19 por el 86·0%, el 76·7% y el 64·0% de participantes en el grupo 18-55 SD/SD, grupo 56-69 SD/SD y grupo >70 SD/SD respectivamente. Se redujo la gravedad de los síntomas después de la vacunación de refuerzo con ChAdOx1 nCOV-19 y solo un participante informó una reacción grave. 65·3%, 72·4% y 42·9% de los participantes en el

grupo 18-55 SD/SD, grupo 56-69 SD/SD y grupo >70 SD/SD respectivamente informaron al menos un adverso sistémico leve a grave reacción después de un refuerzo de ChAdOx1-nCOV19. La incidencia de fiebre medida objetivamente fue baja a los 26·0% en el grupo 18-55 SD/SD, y no ocurrieron casos en ambos grupos 56-69 SD/SD y >70 SD/SD tras la vacunación de sensibilización con ChAdOx1 nCOV-19. Ningún participante de cualquier edad experimentó fiebre objetiva después de la vacunación de refuerzo. Se observó un patrón similar en todos los grupos de edad para los grupos de edad de LD/LD pero con menos síntomas adversos totales. El 61.7%, el 47.5% y el 30.8% de las personas de 18-55 años, 56-69 y >70 años de edad experimentaron síntomas sistémicos de leves a graves después de la primera vacunación con MenACWY y el 67.8%, 31.6 % y 25.0% después de la vacunación de refuerzo con MenACWY respectivamente.

Los acontecimientos adversos no solicitados en los 28 días posteriores a la vacunación considerados al menos posiblemente relacionados con ChAdOx1 nCoV-19 fueron predominantemente de naturaleza leve a moderada y se resolvieron durante el período de seguimiento. Los acontecimientos adversos de laboratorio considerados al menos posiblemente relacionados con la intervención del estudio se autolimitaron y predominantemente de gravedad leve o moderada.

Ha habido 11 acontecimientos adversos graves hasta la fecha, ninguno de los cuales se considera relacionado con la vacuna del estudio.

Usando un inmunoensayo multiplex (MIA) que detectó IgG total frente al dominio de unión al receptor y la proteína de pico trimérico, se ha observado que los participantes

que recibieron una sensibilización estándar con ChAdOx1 nCOV-19 generalmente desarrollaron títulos de anticuerpos más altos el día 28 después de la vacunación que aquellos que recibieron una dosis más baja dosis (mediana de 18-55 LD 6349 unidades de absorbancia [AU], IQR 4438-10640, frente a mediana de 18-55 DE 9807 AU, IQR 5847-17220; mediana de 56-69 LD 5032 AU, IQR 2753-9578, frente a 56-69 SD mediana 6693 AU, IQR2814-1370;> 70 LD mediana 4168 AU, IQR 1542-8846,> 70 SD mediana 3454 AU, IQR 1974-11702. A los 28 días después de la vacunación de refuerzo, se observaron títulos de anticuerpos similares en todos los grupos, independientemente de la edad o la dosis de la vacuna (mediana de 18-55 LD / LD 15114 AU, IQR 9996-22084, frente a 18-55 SD/SD mediana 27294 AU, IQR 16256-37055; 56-69 LD/LD mediana 19156 AU, IQR 8918-26348, frente a 56-69 SD/SD mediana 16170 AU, IQR 10233-40353; >70 LD/LD mediana 16972 AU, IQR 5735-29176, frente a >70 SD/SD mediana 17561 , IQR 10717-338177 (véase la Figura 30). No se observaron anticuerpos con respecto a la proteína de pico.

Se muestran los títulos del ensayo de neutralización de pseudovirus (Monogram PseudoNA IC_{50}) para grupos de dosis baja y dosis estándar en todas las edades (Fig 29). Las respuestas en los grupos de dosis baja alcanzaron su punto máximo el día 42, 14 días después de la vacunación de refuerzo, siguiendo el mismo patrón de respuesta que el ELISA. No hubo diferencias significativas en los títulos de neutralización entre los grupos de edad que recibieron la misma dosis (dosis baja: 18-55 años mediana 172, IQR 111-335 frente a 56-69 años mediana 113, IQR 68-192 frente a 70+ años mediana 164, IQR 81-248, p = 0.2440). Las respuestas en los grupos de dosis estándar siguieron la

misma tendencia, con títulos muy similares que alcanzaron un pico en el día 42 (mediana de 18-55 años 170, IQR 72-283, mediana de 56-69 años 146, IQR 86-443, frente a 70+ SD/SD mediana 128, IQR 70-296, p = 0.6555).

Los receptores de dosis estándar tuvieron títulos similares en el día 42 a los que recibieron solo vacunas de dosis baja (18-55 y, p= 0·5115, 56-69 y, p= 0·4516, 70+ y, p= 0·7664): Figura 29, véase también 29S a continuación

Tabla 29S Estadísticas resumidas para las respuestas ELISpot de interferón-γ

Grupo del Estudio	***Visita***	***N ChAdOx1 único***		***N Dos dosis de ChAdOx1***	
56-69y, LD/LD	0	29	57 [48 ,103]	30	67 [48 ,109]
	14	30	1001 [662 ,1965]	30	1341 [536 ,2029]
	28	28	511 [264 ,790]	29	488 [255 ,1043]
	42			29	501 [253 ,905]
	56	30	207 [111 ,422]	29	333 [179 ,505]
70+y LD/LD	0	49	48 [48 ,68]	41	48 [48 ,71]
	14	50	1027 [488 ,2247]	45	1009 [401 ,1873]
	28	48	405 [234 ,716]	44	395 [207 ,709]
	42			44	291 [172 ,533]
	56	35	166 [118 ,379]	44	266 [120 ,463]
18-55y SD/SD	0			25	58 [48 ,108]
	14			24	1187 [841 ,2428]
	28			10	292 [178 ,803]
	42			23	413 [245 ,675]

Grupo del Estudio	***Visita***	***N*** ***ChAdOx1 único***		***N*** ***Dos dosis de ChAdOx1***	
56-69					
SD/SD	0	25	48 [48 ,65]	30	63 [48 ,84]
	14	21	677 [411 ,1503]	29	797 [383 ,1817]
	28	29	335 [162 ,523]	30	591 [238 ,922]
	42			28	798 [462 ,1186]
70+y					
SD/SD	0	48	63 [48 ,95]	47	73 [48 ,100]
	14	49	971 [447 ,1527]	48	977 [458 ,1914]
	28	48	566 [359 ,979]	49	300 [157 ,492]
	42			47	307 [161 ,516]

En un ensayo de microneutralización de virus vivos (MNA80) realizado en Public Health England, los títulos medios alcanzaron su punto máximo en la mayoría de los grupos reforzados el día 42. No hubo diferencias significativas en los títulos de neutralización entre los grupos de edad el día 42 (dosis baja p = 0·946, dosis estándar p = 0·300), y dentro de cada grupo de edad no hubo diferencias significativas en los títulos de neutralización entre los niveles bajo y estándar. dosis de los receptores de la vacuna en el mismo momento (18-55 y: p=0·3160, 56-69 y: p=0·1468, 70+ y: p=0·745). Figura 31.

Las respuestas de IFN-g ELISpot contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 alcanzaron su punto máximo 14 días después de la primera dosis y no aumentaron significativamente después de la segunda dosis (p = 0.4622 de la prueba de la t pareada del día 28 frente al día 42). Los datos de ELISpot no estaban disponibles para la cohorte 18-55 LD/LD. En los que recibieron dos dosis estándar, hubo una diferencia significativa entre los grupos de edad; los de 56-69 años tuvieron respuestas más altas el día 42 que otros grupos de edad que recibieron la misma vacuna (mediana de IQR, 413 [245, 675] en aquellos 18-55 años, en comparación con 798 [462, 1186] en esos 56-69 años (p = 0.0154), y 307 [161, 516] en los mayores de 70 años o más (p = 5943).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-ChAdOx1 en diferentes grupos de edad y dosis aumentaron con la vacunación de sensibilización con ChAdOx1 en todos los grupos a niveles comparables, pero no aumentaron más después de una segunda dosis de vacuna el día 28. Esto

contrastaba con los anticuerpos de proteína de pico anti-SARS-CoV-2, que se reforzaron 28 días después de la segunda dosis de vacuna. Se correlacionaron los títulos de neutralización de Anti-ChAdOx1 en el momento de la vacuna de refuerzo negativamente con los valores de ELISA estandarizados 28 días después del refuerzo (P = 0.0374) pero no hubo una correlación estadísticamente significativa entre los títulos de neutralización de Anti-ChAdOx1 pre-refuerzo y las respuestas de ELISpot 14 días después la dosis de refuerzo (p = 0.221).

Discusión

Las sólidas respuestas inmunitarias obtenidas en la población de adultos mayores fueron sorprendentes, dado que varios estudios han demostrado que la disminución de la función inmunitaria con la edad conduce a una peor respuesta inmune a las vacunas. Esto es válido para vacunas como la influenza donde existe una memoria inmune preexistente y las vacunas que inducen respuestas inmunes primarias como la hepatitis B. Otras plataformas de vectores adenovirales contra el SARS-CoV-2 o bien han mostrado inmunogenicidad reducida en un grupo de mayor edad (aunque esto era un régimen de dosis única y, por tanto, no se podía comparar directamente con un régimen de estimulación inicial) o bien aún no se han sometido a prueba en una población de mayor edad.

Cabe destacar que las respuestas de anticuerpos anti-picos en nuestro estudio aumentaron después de la vacunación de refuerzo en un intervalo de 1 mes, pero las respuestas de anticuerpos anti-vector neutralizantes no lo hicieron. Tampoco hubo diferencia en la inmunidad antivectorial por edad.

En ausencia de una correlación serológica clara de protección contra el SARS-CoV-2, los estudios clínicos se han centrado en neutralizar los anticuerpos que confieren protección frente a la exposición en modelos animales. Los ensayos de neutralización en vivo requieren mucha mano de obra y solo se pueden realizar en laboratorios especializados en condiciones de seguridad biológica de categoría 3. Se ha mostrado aquí que el dominio de unión al receptor y los títulos de MIA de proteína de pico se correlacionan con los títulos de anticuerpos neutralizantes en diferentes grupos de edad. Esto sugiere que si se demuestra que el anticuerpo neutralizante es protector en los seres humanos, la MIA podría usarse para la evaluación estandarizada de la protección proporcionada por posibles vacunas candidatas en ensayos clínicos.

Ejemplo 17: la dosis de refuerzo del vector viral ChAdOx1 nCoV-19 induce respuestas de anticuerpos multifuncionales y se tolera bien.

El ejemplo 17 se refiere a un ensayo controlado aleatorio de fase I/II, debe leerse junto con los ejemplos anteriores, en particular los ejemplos 11, 15 y 16. Las figuras 32 a 38 muestran datos relacionados con el Ejemplo 17.

Compendio

Los estudios en animales sugieren que el nivel de anticuerpo neutralizante (NAb) contra la proteína de pico puede correlacionarse con la protección, pero otras funciones del anticuerpo pueden ser importantes para prevenir la infección y controlar la invasión celular temprana por el virus. Anteriormente se ha informado sobre la inmunogenicidad y la seguridad tempranas de una vacuna

de coronavirus vector viral, ChAdOx1 nCoV-19. Aquí demostramos, en un ensayo controlado aleatorio de fase I/II, que dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 inducen respuestas de anticuerpos totales y neutralizantes más fuertes que una dosis, y que se observan respuestas similares con un refuerzo 1 o 2 meses después de la primera dosis, en adultos sanos menores de 55 años de edad. Las dosis más altas de vacuna que se usan para reforzar inducen respuestas de anticuerpos más fuertes pero respuestas de células T similares, en comparación con un refuerzo de media dosis que ahorra dosis. Además, demostramos respuestas de anticuerpos funcionales mediadas por Fc (fagocitosis de neutrófilos/monocitos dependiente de anticuerpos, activación del complemento y activación de células NK) que se mejoran sustancialmente con una dosis de refuerzo de la vacuna. También se ha encontrado que una segunda dosis de vacuna fue mejor tolerada que la primera dosis, luego de lo cual las reacciones fueron similares a las reportadas anteriormente. Estos datos respaldaron el régimen de vacunas de dos dosis que ahora se está evaluando en ensayos clínicos de fase III.

Introducción

Si bien los datos preclínicos sugieren que las respuestas inmunitarias inducidas por la infección por SARS-CoV-2 son importantes en la protección contra la reinfección en un modelo animal, no se evaluaron las contribuciones relativas de las diferentes funciones inmunitarias.

La neutralización ha sido la función de anticuerpos medida con más frecuencia, ya que los anticuerpos neutralizantes tienen la capacidad de unirse a la superficie del virión del SARS-CoV-2 y prevenir la entrada de la célula huésped,

con el potencial de transmitir inmunidad esterilizante. Sin embargo, otras funciones de los anticuerpos pueden desempeñar un papel en la recuperación o la protección contra una enfermedad manifiesta.

Aquí se ha descrito una evaluación adicional de las respuestas inmunitarias posteriores a la vacunación de los individuos reclutados para el ensayo clínico de fase I/II de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19. Se compararon diferentes programas de refuerzo y el ahorro de dosis de la dosis de refuerzo, incluyendo la cantidad y calidad de la respuesta inmune inducida. Las personas recibieron una dosis única o un régimen de dos dosis de ChAdOx-1 nCoV-19 en un intervalo de 28 o 56 días. Se describe la inmunidad celular y se cuantificaron y caracterizaron funcionalmente anticuerpos específicos de picos usando una amplia gama de ensayos.

Resultados

Títulos de anticuerpos neutralizantes y MIA

Se midieron los anticuerpos IgG anti-pico con respecto al pico y el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 en un inmunoensayo de serología múltiple. En ambos casos, los títulos de anticuerpos aumentaron después de la primera vacunación con un aumento adicional después de la segunda. A los 14 días después de la segunda dosis, los títulos de IgG no fueron significativamente diferentes entre los que recibieron el refuerzo a los 28 días (GMT 35990, IC del 95% 24408, 53068) o a 56 días (SD/SD D56: GMT 44485, IC al 95% 31714, 62400, p=0.426 y SD/LD D56: GMT 25667, IC al 95% 18814, 35015, p=0.250). Sin embargo, los que recibieron un refuerzo de media dosis tuvieron títulos más bajos 14 días después del refuerzo que los que recibieron la dosis estándar (p=0.020). Se observaron hallazgos similares para

IgG anti-pico y anti-RBD usando MIA (Figura 32, Tabla 17S2 a continuación). Otros 30 participantes eran seropositivos en el momento de recibir una sola

Tabla S2 IgG anti-pico y anti-RBD por inmunoensayo multiplex

Visita	N	MenACWY		N	SD/SD D28		N	SD/SD D56		N	SD/LD D56	
		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]
IgG anti-pico												
0	10	58 (27, 124)	72 [24, 131]	10	141 (24, 809)	71 [46, 249]	20	89 (39, 204)	84 [22, 178]	32	52 (36, 76)	45 [31, 87]
14				10	7040 (2114, 23451)	6358 [3588, 12840]						
28	10	49 (24, 101)	74 [18, 88]	10	13843 (5809, 32988)	11453 [5775, 20988]	19	8611 (4647, 15956)	6185 [3985, 18973]	32	7410 (5280, 10400)	6866 [4203, 14222]
35				10	51762 (30279, 88489)	44205 [33772, 66548]						

Visita	N	MenACWY		N	SD/SD D28		N	SD/SD D56		N	SD/LD D56	
		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]
42				9	**35990 (24408, 53068)**	**34081 [26583, 45472]**						
56	10	56 (26, 122)	93 [20, 110]	10	**34175 (20915, 55842)**	**33307 [20281, 43775]**	20	7722 (4759, 12532)	8790 [3565, 15437]	32	5191 (3625, 7435)	6038 [3304, 8119]
70	10	53 (29, 96)	55 [27, 94]				19	**44485 (31714, 62400)**	**48979 [28038, 83258]**	29	**25667 (18814, 35015)**	**21660 [14953, 45349]**
								P=0.4263 (prueba de la t frente a grupo SD/SD D28 el día 42)			P=0.2504 (prueba de la t frente a grupo SD/SD D28 el día 42) P=0.0201 (prueba de la t frente a	

Visita	**N**	**MenACWY**		**N**	**SD/SD D28**		**N**	**SD/SD D56**		**N**	**SD/LD D56**	
		GMC (IC del 95%)	**Mediana [IQR]**		**GMC (IC del 95%)**	**Mediana [IQR]**		**GMC (IC del 95%)**	**Mediana [IQR]**		**GMC (IC del 95%)**	**Mediana [IQR]**
											grupo SD/SD D56 el día 70)	
84	10	48 (23, 101)	67 [20, 80]				19	**40176 (27816, 58027)**	**41927 [21197, 85118]**	31	**15761 (7688, 32310)**	**17965 [11238, 47038]**
IgG anti-RBD												
0	10	16 (9, 28)	10 [9, 33]	10	47 (9, 255)	27 [16, 42]	20	18 (9, 36)	12 [8, 24]	32	15 (11, 20)	13 [9, 21]
14				10	1584 (331, 7573)	1274 [396, 3612]						
28	10	17 (10, 29)	12 [11, 33]	10	5356 (1959, 14641)	4494 [2245, 9729]	19	2729 (1330, 5599)	2252 [925, 8231]	32	1823 (1154, 2879)	2521 [865, 4099]

Visita	N	MenACWY		N	SD/SD D28		N	SD/SD D56		N	SD/LD D56	
		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]		GMC (IC del 95%)	Mediana [IQR]
35				10	29478 (18735, 46381)	25572 [20912, 31747]						
42				9	21992 (15400, 31405)	23576 [15516, 24870]						
56	10	15 (8, 28)	10 [6, 27]	10	19764 (12476, 31311)	17670 [12041, 22502]	20	3125 (1842, 5302)	3352 [1548, 5583]	32	1459 (931, 2287)	1536 [708, 2969]
70	10	18 (10, 32)	14 [10, 30]				19	21045 (14800, 29925)	24181 [11779, 34420]	29	10565 (7343, 15200)	9030 [6467, 19581]
84	10	15 (7, 29)	14 [6, 35]				19	20627 (14327, 29696)	20373 [13502, 36658]	31	7423 (3663, 15044)	9260 [4187, 21572]

vacunación y los títulos de IgG anti-pico aumentaron 10 veces después de la vacunación. La Figura 32 muestra el curso temporal de las respuestas de IgG para tres grupos de estimulación-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19; SD/SD: dos dosis estándar administradas con 28 o 56 días de diferencia, SD/LD: dosis estándar de sensibilización seguida de refuerzo de dosis baja con 56 días de diferencia y para dos dosis de la vacuna comparadora MenACWY. Las líneas punteadas muestran puntos de tiempo en los que se produjo el refuerzo. El gráfico muestra la mediana y el rango intercuartílico. AU/ml = Unidades arbitrarias/ml. Respuestas anti-RBD (Dominio de Unión al Receptor) del panel izquierdo. Respuestas anti-pico del panel derecho (proteína de pico del SARS-COV-2). La línea discontinua indica las respuestas en 30 participantes que recibieron solo una dosis de ChAdOx1 nCoV-19 y fueron seropositivos al inicio del estudio (umbral de seropositividad definido como IgG anti-pico> 1000 AU/ml).

Se evaluaron los anticuerpos neutralizantes usando un ensayo de microneutralización que informaba el recíproco de la dilución de suero necesaria para reducir la infección de células individuales por SARS-CoV-2 en el 80% (MNA_{80}). Se indujeron Nab después de las vacunaciones de sensibilización y aumentaron significativamente después de una dosis de refuerzo en los 3 grupos de ChAdOx1 nCoV-19. La mediana de los títulos de NAb a los 14 días después del refuerzo fueron 136 (IQR 115, 241) para SD/SD D28, 169 (IQR 134, 372) para SD/LD D56, y 315 (IQR 224, 531) for SD/SD D56.

La Figura 33 muestra el curso temporal del título de microneutralización a IC_{80} para tres grupos de

estimulación-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19; SD/SD: dos dosis estándar administradas con 28 o 56 días de diferencia, SD/LD: dosis estándar de sensibilización seguida de refuerzo de dosis baja con 56 días de diferencia y para dos dosis de la comparadora MenACWY. Las barras de errores muestran medianas y rangos intercuartílicos.

No se observó actividad de NAb en el grupo MenACWY. Los anticuerpos neutralizantes también se determinaron en un ensayo de neutralización de pseudovirus que informaba IC_{50}. La mediana de los títulos de NAb en el ensayo de pseudovirus a los 14 días tras el refuerzo fueron 451 (IQR 212, 627) para SD/SD D28, 253 (IQR 100, 391) para SD/LD D56 y 424 (IQR 229, 915) para SD/SD D56 (véase la Figura 38, y Tabla 17S3, a continuación).

Table 17S3 Anticuerpo neutralizante S3 medido en el ensayo de pseudovirus (monograma IC50)

Visita	**N**	**SD/SD D28 Mediana [IQR]**	**N**	**SD/SD D56 Mediana [IQR]**	**N**	**SD/LD D56 Mediana [IQR]**
0	10	40 [40, 40]	20	40 [40, 40]	32	40 [40, 40]
28	10	163 [61, 346]				
35	7	334 [179, 529]				
42	9	451 [212, 627]				
56			20	68 [40, 151]	32	40 [40, 76]
70			19	424 [229, 915]	29	253 [100, 391]

Clase y Subclase de Anticuerpos

Se determinaron las clases y subclases de anticuerpos dentro de la respuesta anti-pico. Basándose en el análisis de isotipos previos después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 (D. Barouch et al.2018), se ha enfocado en medir los títulos de IgA e IgM de anticuerpos pico anti-SARS-CoV-2. La vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 aumentó los títulos de IgM e IgA con una respuesta máxima medida 28 días después de la sensibilización para IgM. No hubo diferencia en la respuesta medida 14 días después de la dosis de refuerzo SD o LD, y la respuesta posterior al refuerzo fue de una magnitud similar a la SD/SD con un intervalo de 28 días. La Figura 34 muestra respuestas de isotipo de inmunoglobulina específica de pico de SARS-CoV-2 inducidas por regímenes de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19. Los voluntarios recibieron una dosis estándar (SD) de ChAdOx1 nCoV-19 el día 0, seguida de una segunda vacunación con SD el día 56 (panel de la izquierda) o dosis baja (LD) el día 56 (panel central) o SD el día 28 (panel de la derecha) de ChAdOx1 nCoV-19. Se cuantificaron las respuestas de IgA e IgM específicas del trímero de pico de SARS-CoV-2 mediante ELISA y se expresaron como unidades de ELISA. Las líneas continuas conectan muestras del mismo participante. Las líneas continuas en negrita muestran la mediana con IQR.

Las muestras de suero que fueron IgG positivas 28 días después de la vacunación se analizaron para las subclases de IgG anti-pico. Las respuestas de IgG1 e IgG3 fueron fácilmente detectables el día 28 y estaban en un nivel similar el día 56 en regímenes con un intervalo de 56 días.

Después de la vacunación de refuerzo, la respuesta mediana de IgG1 no aumentó en aquellos que recibieron el régimen de dosis estándar con un intervalo de 28 días, aunque esto puede estar limitado por el tamaño del grupo pequeño. Las respuestas de IgG1 aumentaron 14 días después de un refuerzo de SD o LD en regímenes con un intervalo de 56 días, sin diferencia medida debido a la dosis. Las respuestas de IgG3 aumentaron después de la vacunación de refuerzo en los tres regímenes independientemente del intervalo o la dosis. La respuesta fue predominantemente IgG1 e IgG3, con bajos niveles de IgG2 e IgG4.

La Figura 35 muestra respuestas de subclase de IgG específica de pico de SARS-CoV-2 inducidas por regímenes de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19. Los voluntarios recibieron una dosis estándar (SD) de ChAdOx1 nCoV-19 el día 0, seguida de una segunda vacunación con SD el día 56 (panel de la izquierda) o dosis baja (LD) el día 56 (panel central) o SD el día 28 (panel de la derecha) de ChAdOx1 nCoV-19. Se analizaron los voluntarios con IgG específica de pico de SARS-CoV-2 medible en el día 28 para subclases de IgG. Las respuestas de anticuerpos específicos de picos de SARS-CoV-2 se cuantificaron mediante ELISA. Las respuestas de IgG1 e IgG3 se expresaron como unidades ELISA y las respuestas de IgG2 e IgG4 se expresaron como DO a 405 nm. Las líneas continuas conectan muestras del mismo participante. Las líneas continuas en negrita muestran la mediana con IQR.

Esta respuesta predominante de IgG de tipo Th1 está de acuerdo con otros estudios que investigan la preparación de vacunas con vectores adenovirales en seres humanos. Estos análisis destacan la similitud en la respuesta de

anticuerpos inducida después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 independientemente del intervalo o dosis de refuerzo.

Funcionalidad de anticuerpos

Se exploró adicionalmente la función de los anticuerpos para determinar la capacidad de los anticuerpos inducidos por la vacunación para apoyar la fagocitosis de monocitos dependiente de anticuerpos (ADMP) y la fagocitosis de neutrófilos (ADNP). Se indujeron ambas funciones por la primera vacunación y aumentaron sustancialmente con la segunda, con una tendencia hacia un aumento mayor cuando el intervalo entre las dosis fue de 56 en lugar de 28 días, y cuando la dosis de refuerzo fue SD en lugar de LD (véase la Figura 36A y 36B y Tabla 17S4, a continuación).

Tabla 17S4: Fagocitosis de monocitos dependiente de anticuerpos (ADMP), fagocitosis de neutrófilos (ADNP), deposición del complemento (ADCD) y activación de células asesinas naturales (ADNKA) en participantes del ensayo, plasma convaleciente y plasma prepandémico

Grupo	**Punto de tiempo**		**ADNP**		**ADMP**		**ADCD (log10 unidades)**		**ADNKA**
		N	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**
MenACWY	**0**	2	0.02 [0.01, 0.02]	2	0.17 [0.14, 0.2]	2	2.27 [2.14, 2.40]	2	0.58 [0.53, 0.63]
MenACWY	**56**	3	0.02 [0.02, 0.03]	3	0.11 [0.1, 0.19]	3	1.99 [1.98, 2.31]	2	0.87 [0.80, 0.93]
MenACWY	**70**	3	0.02 [0.01, 0.02]	3	0.19 [0.17, 0.24]	3	2.68 [2.61, 2.81]	2	1.63 [1.45, 1.82]
SD/LD D56	**0**	20	0.01 [0.01, 0.02]	24	0.13 [0.1, 0.18]	11	2.53 [2.41, 2.73]	22	0.4 [0.22, 0.94]
SD/LD D56	**56**	24	0.07 [0.04, 0.18]	24	0.29 [0.21, 0.38]	12	2.84 [2.53, 2.91]	22	2.03 [1.43, 3.13]

Grupo	Punto de tiempo		ADNP		ADMP		ADCD (log10 unidades)		ADNKA
		N	Mediana [IQR]	N	Mediana [IQR]	N	Mediana [IQR]	N	Mediana [IQR]
SD/LD D56	**70**	23	0.68 [0.32, 0.77]	22	0.73 [0.49, 0.96]	12	3.2 [3.01, 3.56]	22	5.29 [3.61, 6.13]
SD/SD D28	**0**							4	1.17 [0.21, 2.95]
SD/SD D28	**14**	8	0.09 [0.02, 0.14]	9	0.23 [0.19, 0.41]			8	2.35 [2.15, 4.73]
SD/SD D28	**28**	9	0.11 [0.03, 0.4]	9	0.3 [0.13, 0.61]			9	3 [2.06, 5.66]
SD/SD D28	**35**	10	0.67 [0.55, 0.73]	10	0.89 [0.64, 1.01]			10	5.69 [5.12, 7.42]
SD/SD D28	**42**	7	0.76 [0.71, 0.88]	9	1.02 [0.82, 1.05]			8	3.96 [3.44, 5.36]
SD/SD D28	**56**	9	0.67 [0.41, 0.8]	10	0.73 [0.54, 0.97]			9	3.91 [3.05, 5.25]

Grupo	**Punto de tiempo**		**ADNP**		**ADMP**		**ADCD (log10 unidades)**		**ADNKA**
		N	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**	**N**	**Mediana [IQR]**
SD/SD D56	**0**	16	0.02 [0.01, 0.03]	18	0.18 [0.12, 0.31]	10	2.6 [2.37, 2.76]	19	0.96 [0.12, 1.32]
SD/SD D56	**56**	18	0.08 [0.04, 0.26]	19	0.32 [0.25, 0.38]	10	3.01 [2.74, 3.57]	19	2.27 [1.31, 3.21]
SD/SD D56	**70**	18	1.02 [0.79, 1.17]	19	1.14 [0.75, 1.42]	10	4.83 [4.15, 5.4]	19	5.78 [4.33, 7.7]
Pre-2020		14	0 [0, 0.01]	19	0.18 [0.12, 0.19]			16	1.4 [0.78, 2.69]
Conv - Leve		33	0.31 [0.1, 0.62]	36	0.39 [0.23, 0.65]	24	3.88 [3.33, 4.49]	21	5.31 [2.97, 8.77]
Conv - Mod/Grave		6	0.96 [0.92, 1.03]	6	1.28 [1.23, 1.33]	6	5.53 [5.41, 5.57]	4	6.57 [4.93, 9.63]
Conv - Asintomático		6	0.34 [0.2, 0.58]	6	0.4 [0.23, 0.56]	7	3.75 [3.01, 3.8]	3	1.21 [0.86, 8.94]

La Figura 36 muestra la fagocitosis de monocitos dependiente de anticuerpos (A) y la fagocitosis de neutrófilos (B), la deposición del complemento (C) y la activación de células asesinas naturales (D) en participantes del ensayo, plasma convaleciente y plasma prepandémico y funcionalidad de anticuerpos dependiente de Fc longitudinal en receptores de la vacuna ChAdOx1-nCoV19, pacientes convalecientes de COVID-19 y muestras prepandémicas. En la Figura 36, se muestran lo siguiente: (a) Puntuaciones de fagocitosis de monocitos dependientes de anticuerpos (ADMP) para los receptores de la vacuna que recibieron 2 dosis estándar con 28 días de diferencia (SD/SD D28 n = 10) o 56 días (SD/SD D56 n = 19), o un estándar y una dosis baja con un intervalo de 56 días (SD/LD D56 n = 24). También se muestran pacientes convalecientes con COVID-19 (Conv, n = 48) y controles prepandémicos (Pre-2020, n = 19). Se muestran la mediana y el rango intercuartílico de las respuestas normalizadas para cada punto de tiempo estudiado. (b) Puntuaciones de la fagocitosis de neutrófilos dependiente de anticuerpos (ADNP) para los receptores de la vacuna, los pacientes convalecientes con COVID-19 y los controles prepandémicos. SD/SD D28 n=10, SD/SD D56 n=18, SD/LD D56 n= 24, Conv n=45, pre-2020 n=14. Se muestran la mediana y el rango intercuartílico de las respuestas normalizadas para cada punto de tiempo estudiado. (c) Depósito de complemento dependiente de anticuerpos (ADCD) Se muestran las medianas de la intensidad de fluorescencia mediana restada (MFI) de fondo y los rangos intercuartílicos para los receptores de la vacuna que recibieron 2 dosis estándar con 56 días de diferencia (n =

10), o una dosis estándar y una dosis baja con 56 días de diferencia (n = 12). También se muestran los pacientes convalecientes con COVID-19 (Conv, n = 37).

(d) Activación de células asesinas naturales dependientes de anticuerpos (ADNKA). Se muestra la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de células NK CD107a+ en relación con los pocillos de control para los receptores de la vacuna que recibieron 2 dosis estándar con 28 días de diferencia (n = 10) o 56 días de diferencia (n = 19), o una dosis estándar y una dosis baja de 56 días aparte (n = 22) y pacientes convalecientes con COVID-19 (n = 28) y controles anteriores a 2020 (n = 16).

(E-H) Gráficos polares de datos normalizados en todos los puntos de tiempo y grupos usando la normalización mínima-máxima. El tamaño de cada gráfico representa el valor medio de cada ensayo en el momento de la dosis de refuerzo 14 días después. Para los grupos potenciados, el punto de tiempo que se muestra es 14 días después del refuerzo.

En comparación con las muestras de suero y plasma tomadas de pacientes convalecientes con COVID entre 28 y 91 días después de una prueba de PCR positiva, tanto la ADMP como la ADNP fueron más altas en el grupo vacunado después de la segunda dosis. Las muestras de suero tomadas antes de 2020 fueron negativas en ambos ensayos y no hubo cambios en estas funciones en los participantes que recibieron la vacuna MenACWY.

La deposición del complemento dependiente de anticuerpos (ADCD) también se indujo por la vacunación de sensibilización y aumentó significativamente después de las dosis de refuerzo en D56. Se observó una intensidad de fluorescencia media (MFI) más alta en los receptores de una

dosis de refuerzo estándar en comparación con los que recibieron la mitad de la dosis (Figura 36C).

También se exploró la capacidad de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 para inducir la activación de células NK dependiente de anticuerpos (ADNKA) en seres humanos, y se informó como la capacidad de desencadenar la expresión de CD107a (Figura 36D). Los resultados demuestran que la dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 indujo respuestas bajas de ADNKA que fueron reforzadas por la segunda dosis administrada el día 28 o el día 56. La dosis usada para el refuerzo el día 56 no tuvo ningún impacto en el ADNKA resultante medido en el día 70 (SD/SD 56 mediana 5.78 IQR 4.33, 7.7, SD/LD 56 mediana 5.29 IQR 3.61, 6.13), mientras que ADNKA medido el día 42 después del refuerzo en el D28 fue menor (mediana 3.96 IQR 3.44, 5.36). Las respuestas observadas después de dos dosis de vacunas estuvieron dentro de un rango similar a las detectadas en una cohorte de 21 pacientes COVID convalecientes (mediana 5.31 IQR 2.97, 8.77) mientras que no se detectaron cambios después de la vacunación MenACWY.

La Figura 37 muestra la respuesta de ELISpot de IFNγ a péptidos que abarcan el inserto de vacuna de pico del SARS-CoV-2 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19. La respuesta total de linfocitos T *ex vivo* al inserto de vacuna de pico del SARS-CoV-2 codificado dentro de la vacuna se muestra a lo largo del tiempo (IFNγ ELISpot; células formadoras de puntos por 10^6 PBMC; calculado sumando las respuestas a los grupos de péptidos corregidos por los antecedentes; materiales y métodos). La respuesta se muestra como mediana con rango intercuartílico por régimen de vacunación; ChAdOx1 única: una dosis estándar de ChAdOx1 nCoV-19, SD/SD: dos dosis estándar de ChAdOx1 nCoV-

19, SD/LD: dosis estándar de sensibilización y dosis de refuerzo de dosis baja. Los participantes recibieron una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 al día 28 (SD/SD D28) o al día 56 (SD/SD D56, SD/LD D56. El LLD es 48 SFC y se indica con una línea punteada.

Discusión

Se ha presentado una fuerte evidencia de que el refuerzo mejora tanto el título como la funcionalidad de la respuesta de anticuerpos, lo que refuerza los hallazgos preliminares sobre la inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19. Adicionalmente, se ha mostrado una clara evidencia de que una dosis de refuerzo es menos reactogénica que la primera dosis. Los datos presentados aquí fueron clave para respaldar la decisión de cambiar de un régimen de una dosis a un régimen de dos dosis para los ensayos de fase III de ChAdOx1-nCoV19 que están ahora en curso.

La tolerabilidad de las vacunas es importante para la aceptación pública, y el perfil de reactogenicidad esperado de los diferentes productos que pueden usarse para controlar el SARS-CoV-2 debe caracterizarse completamente y comunicarse a los futuros receptores de la vacuna antes de su implementación. En ejemplos anteriores, hubo una tendencia hacia una menor reactogenicidad después de la segunda dosis de ChAdOx1 nCoV-19 en un pequeño número de vacunados. Ese hallazgo ahora se confirma aquí en una cohorte más grande en la que las segundas dosis fueron consistentemente menos reactogénicas que la primera, independientemente del intervalo de dosis. La observación de reactogenicidad reducida en la segunda dosis contrasta con los perfiles informados de dos vacunas de ARNm para COVID19 y una tecnología de vacuna con adyuvante proteico,

en la que, aunque generalmente bien tolerada, la reactogenicidad aumentó con la segunda dosis. Este fenómeno es digno de mención ya que es concebible que en el futuro se requieran dosis adicionales para mantener la inmunidad. Los programas que combinan las diferentes tecnologías de vacunas en regímenes de refuerzo primario heterólogos pueden maximizar la inmunogenicidad, al tiempo que limitan la reactogenicidad, y podrían dar lugar a estrategias innovadoras que aprovechen los puntos fuertes de las diferentes tecnologías.

No hubo asociación entre la reactogenicidad y la presencia o ausencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 o ChAdOx1 en el momento de la vacunación. Este es un hallazgo importante cuando se considera el uso prolongado de la vacuna después de la licencia, cuando no se realizará la detección de anticuerpos antes de la vacunación y una proporción variable de la población ya habrá estado expuesta al SARS-CoV-2. Los anticuerpos contra el vector ChAdOx1 son inducidos por la primera vacunación, pero no evitan el refuerzo y no aumentan más con la segunda vacunación con un intervalo de 4 u 8 semanas.

Aquí vemos la inducción de IgA e IgM además de las actividades funcionales dependientes de anticuerpos ADMP, ADNP, ADCD y ADNKA, y son más fuertes después de una segunda dosis.

Si bien el título de anticuerpos neutralizantes que pueden prevenir la invasión celular ha surgido como el correlato más fuerte de protección en los estudios preclínicos de la vacuna SARS-CoV-2, las actividades funcionales no neutralizantes se reconocen cada vez más como importantes mediadores del control viral, trabajando en conjunto con

células T CD8+ para destruir células infectadas por virus en el huésped (Excler et al. 2014; DiLillo et al. 2014). En estudios preclínicos de vacunación de SARS-CoV-2, las funciones de anticuerpos mediadas por Fc, incluyendo ADCD y ADNKA, se correlacionaron con la protección contra la infección después de la exposición viral y, en combinación con anticuerpos neutralizantes, mejoraron la capacidad para distinguir los macacos rhesus completamente protegidos de los que se vuelven infectados (Atyeo et al. 2020; Yu et al. 2020; Mercado et al. 2020). En este estudio, las respuestas de ADNP, ADMP y ADNKA inducidas por ChAdOx1 nCoV-19 estuvieron en el mismo rango o más alto que el observado en un conjunto de muestras de individuos convalecientes recolectadas más de un mes después de la enfermedad. Un estudio que comparó las respuestas humorales del SARS-CoV-2 en pacientes que sobrevivieron con los que murieron, encontró que las respuestas humorales específicas de S, incluyendo las actividades funcionales mediadas por Fc, se enriquecieron entre los individuos que sobrevivieron, mientras que las respuestas específicas de la nucleocápside se elevaron en individuos fallecidos (anticuerpos de la nucleocápside no se inducen por ChAdOx1 nCOV-19) (Atyeo et al. 2020). Estos datos sugieren que los anticuerpos funcionales frente a la proteína S pueden ser importantes en la resolución de la enfermedad.

Métodos

Ensayo de Activación de Células Asesinas Naturales Dependientes de Anticuerpos (ADNK)

Para evaluar la activación de células NK dependiente de anticuerpos específicos de antígeno (ADNKA), se recubrieron placas ELISA Nunc Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Fisher)

con proteína de pico del SARS-CoV-2 recombinante a 2.5 ug/ml en disolución de carbonato/bicarbonato (Sigma Aldrich) durante 16 horas a 4°C. Se lavaron las placas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloquearon con BSA al 5% en PBS. Se sembraron en placas muestras de plasma y suero sin diluir por duplicado. Después de la incubación durante dos horas a 37°C, se lavaron las placas y se añadieron 10^5 células asesinas naturales (línea celular NK92.05-CD16, Colección Americana de Cultivos Tipo, y descritas en Binyamin et al. (Binyamin et al. 2008) por pocillo en la presencia de Brefeldin A (10 ug/ml, Sigma Aldrich), Golgi Stop (BD Biosciences) y CD107a (PE, clon H4A3, BD Biosciences). Se tiñó por separado una muestra de células con CD56 (BV786, clon NCAM16, BD Biosciences) y CD16 (AF594, clon GRM-1, Santa Cruz Biotechnology) para verificar la expresión consistente de CD16. Tras 5 horas de incubación, se transfirieron las células a placas de fondo en V y se tiñeron para el análisis de FACS. Se identificaron las células NK vivas mediante tinción LIVE/DEAD reparable (R780, BD Biosciences). Se fijaron las células y se adquirieron los datos utilizando un BD Fortessa. Los porcentajes de células NK CD107a+ en relación con los pocillos de control con proteína de pico y tampón de bloqueo solo se determinaron en el software FlowJo (versión 10.7.1). Se sembraron en placas por triplicado un grupo prepandémico de tres donantes y un grupo de seis individuos hospitalizados infectados con SARS-CoV-2 en cada placa, para el control de calidad de cada ensayo.

Acoplamiento de Perlas para Ensayos de ADMP y ADNP

Se acoplaron recientemente microesferas rojas fluorescentes (580/605) marcadas con neutrAvidina (Thermo Fisher, F-8875)

a la proteína de pico de SARS-CoV2 biotinilada para cada ensayo. Se acopló la proteína de pico (a una concentración de 0.388 µl/ml) a las perlas en una proporción de 3:1 y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se lavaron las perlas dos veces con BSA al 0.1% y se diluyeron 100 veces en BSA al 0.1%. Se añadieron 10 µl a cada pocillo en los ensayos de ADNP y ADMP.

Fagocitosis de neutrófilos dependiente de anticuerpos (ADNP)

El ensayo ADNP se basa en un protocolo descrito anteriormente (Karsten et al. 2019) con algunas modificaciones. La sangre completa del donante, extraída en tubos de heparina sódica, se trató con tampón de lisis de cloruro de amonio-potasio (ACK) (Thermo Fisher, A1049201) durante 5 minutos, seguido de centrifugación para colectar glóbulos blancos. Se lavaron las células con DPBS (Sigma, D8537), se contaron y se ajustaron a 2.5 x 10^5 células/ml en un medio que consistía en medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma, R5886) complementado con penicilina/estreptomicina 100 U/ml (Sigma, P4458) y L-glutamina 20 mmol/L (Sigma, G7513).

Se añadió suero diluido 100x en RPMI a perlas acopladas con antígeno en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se analizaron todas las muestras por duplicado y cada placa contenía 2 muestras de control de calidad (QC) además de los controles negativos apropiados. Se lavaron los pocillos con DPBS y se añadieron un total de 500,000 glóbulos blancos por pocillo seguido de una incubación de 1 hora más a 37°C. Luego se tiñieron las células usando un cóctel de CD3 Alexa700 (BD, 557943), CD14 APC-Cy7 (BD, 557831) y CD66b Pacific Blue (Biolegend,

305112) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después del lavado y la fijación con paraformaldehído al 4% (PFA, Santa Cruz Biotechnology, SC-281692), se determinó la proporción de células que contenían perlas marcadas con fluorescencia mediante citometría de flujo (BD, Fortessa X20).

Se analizaron los datos con Flowjo (BD, Versión 10), usando una estrategia de activación para seleccionar neutrófilos. Se calcularon las puntuaciones fagocíticas normalizadas multiplicando el porcentaje de células positivas a las perlas por la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las perlas dentro de estas células y normalizándolas frente a una muestra de control de calidad establecida en 1. Como se procesaron varias placas durante un experimento, las placas fallaron si alguno de los promedios de las muestras de QC caía fuera del rango medio +/- 2 SD de ese CC en particular en las placas. Además, se excluyeron las muestras de análisis posteriores si las réplicas mostraban un coeficiente de variación (CV) superior al 25%. Todos los datos del artículo actual se derivan de un experimento.

Fagocitosis de monocitos dependiente de anticuerpos (ADMP)

El ensayo ADMP se basa en un protocolo descrito anteriormente (Ackerman et al. 2011) con algunas modificaciones. En resumen, se cultivó y mantuvo una línea celular THP-1 monocítica humana (ATCC) usando las instrucciones del proveedor. Se diluyó suero 4000x en RPMI y se añadió a perlas acopladas con antígeno en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 2 horas a 37°C. Se analizaron todas las muestras por duplicado y cada placa contenía 2 muestras de control de calidad (QC) además de los controles negativos apropiados. Al final del período de

incubación de 2 horas, se lavaron los pocillos con RPMI y 250,000 células THP-1 diluidas en un medio que consistía en medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma, R5886) complementado con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma, P4458) y se añadieron L-glutamina 20 mmol/L (Sigma, G7513) a cada pocillo. Las células se incubaron con las perlas recubiertas de anticuerpo durante 18 horas a 37°C. Después del período de incubación de 18 horas, se lavaron las células con PBS y se fijaron usando PFA al 4%. Se midió la proporción de células que contienen perlas marcadas con fluorescencia mediante citometría de flujo (BD, Fortessa X20).

Se analizaron los datos con Flowjo (BD, Versión 10), usando una estrategia de activación para seleccionar las células THP-1. Se calcularon las puntuaciones fagocíticas normalizadas multiplicando el porcentaje de células positivas a las perlas con la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las perlas dentro de estas células y normalizándolas frente a una muestra de control de calidad establecida en 1. Como se procesaron varias placas durante un experimento, las placas fallaron si alguno de los promedios de las muestras de QC caía fuera del rango medio +/- 2 SD de ese CC en particular en las placas. Además, se excluyeron las muestras de análisis posteriores si las réplicas mostraban un coeficiente de variación (CV) superior al 25%. Todos los datos del artículo actual se derivan de un experimento.

Depósito de complemento dependiente de anticuerpos (ADCD)

Se acoplaron perlas fluorescentes azules magnéticas de carboxilo SPHERO™ (Spherotech, EE. UU.) con proteína de pico completa del SARS-CoV-2 (Lake Pharma, EE. UU., Ref.

46328) usando un proceso Sulpho-NHS/EDC de dos etapas detallado en Brown et al. La proteína de pico se incluyó a niveles de saturación y el acoplamiento se confirmó por la unión de IgG de un donante convaleciente de Covid-19 que se sabe que tiene altos niveles de IgG de proteína anti-pico. Se añadió suero de prueba inactivado por calor (2.5 µl, por duplicado) a 22.5 µl de tampón de bloqueo (PBS, BSA al 2%, BB) y se tomaron 5 µl para diluciones seriadas de 5 veces para obtener las diluciones finales de 1:20, 1:100, 1:500, 1:2500. Se añadieron 20 µl de perlas magnéticas recubiertas con proteína de punta del SARS-CoV-2 (50 perlas por µl) y se incubó la mezcla a 25°C durante 30 min con agitación a 900 rpm. Se lavaron las perlas dos veces en 200 µl de tampón de lavado (BB + Tween-20 al 0.05%) luego se resuspendieron en 50 µl e BB que contenía el 10% de plasma humano empobrecido en IgG e IgM (preparado según (Lesne et al. 2020)) y se incubaron a 37°C durante 15 min con agitación a 900 rpm. A continuación, se lavaron las perlas dos veces con 200 µl de tampón de lavado y se resuspendieron en 100 µl de Anticuerpo policlonal C3c antihumano de conejo conjugado con FITC (Abcam, RU) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de dos lavados más con 200 µl de tampón de lavado, las muestras se resuspendieron en 60 µl de solución salina equilibrada de Hank y se analizaron utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter, EE. UU.) y el software CytExpert. Para cada muestra, se recogió un mínimo de 100 perlas. La mediana de la fluorescencia de FITC de un control sin anticuerpos del complemento solo se resta de cada muestra de prueba para dar la mediana de la fluorescencia de FITC dependiente de anticuerpos. Se

calcularon los títulos de punto final interpolados en Microsoft Excel para determinar la dilución en la que la mediana de FITC dependiente de anticuerpos cruzó el umbral de prueba negativo (la fluorescencia obtenida usando muestras anteriores a 2020 confirmadas como negativas por ELISA + 3 veces la desviación estándar).

Inmunoensayo multiplexado de descubrimiento de mesoescala (MIA)

Se midieron las respuestas específicas de antígeno a la vacunación con ChAdOx1 nCoV19 y/o a la infección natural por SARS-CoV-2 usando un inmunoensayo multiplexado (MIA). El MIA se desarrolló y se realizó por Meso Scale Discovery (MSD), Rockville, MD, y se describe en Folegatti *et al* (Folegatti et al. 2020). En resumen, se bloquearon las placas secas recubiertas con SARS-CoV-2 Spike y RBD, se lavaron e se incubaron con muestras, estándares de referencia y controles. Se desarrollaron los controles de calidad internos y los reactivos estándar de referencia a partir de suero humano combinado. Tras las etapas de incubación y lavado, se añadió el anticuerpo de detección (Anticuerpo anti-IgG humana MSD SULFO-TAG™), se incubó y se lavaron las placas de nuevo. Se añadió tampón de lectura B MSD GOLD™ y se leyeron las placas usando un lector MESO® SECTOR S 600. Se establecieron las muestras en el límite inferior de cuantificación en 2.58 para el pico y 2.60 para RBD, mientras que las muestras en el límite superior se establecieron en 320000 para el pico y 317073 para RBD.

Ensayo de microneutralización de Public Health England (PHE MNA80)

Usando un método similar al descrito anteriormente para PHE MNA80 (y se describe en (Folegatti et al. 2020), el ensayo

de microneutralización (MNA) mide microplacas usando el analizador ImmunoSpot® S6 Ultra-V. En resumen, se añadieron mezclas de suero/virus a monocapas de células Vero/E6 susceptibles de virus durante una hora antes de la sustitución del inóculo con superposición (CMC al 1% p/v en medio completo). Después de una incubación de 24 horas, se fijaron las células con formaldehído. Se detectaron las microplacas usando un anticuerpo SARS-CoV-2 específico para la proteína de pico del SARSCoV-2 RBD y un conjugado de HRP de conejo. Se detectaron las microplacas infectadas usando el sustrato TrueBlueTM. Recuentos resultantes analizados en el software SoftMax Pro v7.0.

Ensayo de neutralización de pseudotipo de Monogram Biosciences (PseudoNA)

Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes (Nab) usando una partícula de pseudovirus SARSCoV-2 basada en lentivirus que expresaba proteína de punta (Número de registro: MN908947.3). El ensayo de nAb de CoV de neutralización de pseudotipo se describe en (Folegatti et al. 2020) y se basa en metodologías descritas anteriormente que usan pseudoviriones del VIH-1 (Petropoulos et al. 2000; Richman et al. 2003; Whitcomb et al. 2007).

En resumen, se incubaron muestras de suero diluidas e inactivadas por calor con virus pseudotipado del SARS-CoV2. Se determinaron los títulos de Nab creando 9 diluciones triples en serie de las muestras de prueba. Como control se utilizó un virus pseudotipado irrelevante. Después de la incubación de sueros diluidos y partículas de pseudovirus, se añadieron células transfectadas con HEK 293 ACE2, se incubaron las placas y se midió la expresión de luciferasa. Los títulos de Nab se informan como el recíproco de la

dilución de suero que confiere el 50% de inhibición (ID50) de la infección por pseudovirus. % de Inhibición = 100% - (((RLU (Vector + Muestra + Diluyente) - RLU (Previo))/(RLU (Vector + Diluyente) - RLU (Previo))) x 100%). Ensayo de SARS CoV-2 nAb se incluyen sueros de control positivo y negativo en cada placa de ensayo de 96 pocillos.

Ejemplo 18: Fenotipado detallado de la respuesta inmune inducida por la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 en un ensayo clínico de fase 1/2.

El ejemplo 18 se refiere a un ensayo controlado aleatorio de fase I/II, debe leerse junto con los ejemplos anteriores, en particular los ejemplos 11, 15, 16 y 17. Las figuras 39 a 44 muestran datos relacionados con el Ejemplo 18.

Compendio

Se espera que las fuertes respuestas de células T con sesgo Th1 sean óptimas para impulsar respuestas inmunitarias humorales protectoras, respuestas inmunitarias mediadas por células que controlan la infección y reducir el potencial de mejora de la enfermedad. Aquí se ha descrito en detalle las respuestas inmunes en adultos de 18-55 años después de la vacunación con ChAdOx1 nCOV-19, demostrando una inducción de una respuesta sesgada Th1 caracterizada por la secreción de citocinas de IFN-γ y TNFα por células T $CD4^+$ y producción de anticuerpos predominantemente de la Subclases de IgG1 e IgG3, la última de las cuales se correlacionó con la actividad neutralizante. También se indujeron células T $CD8^+$, de fenotipos monofuncional, polifuncional y citotóxico. En conjunto, estos resultados sugieren un perfil inmunológico favorable inducido por la vacuna ChAdOx1 nCoV-19.

Aquí, se ha proporcionado una descripción detallada de la respuesta inmune tras la administración de una o dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19. De manera importante, se ha demostrado con varias metodologías (perfil de citocinas multiplex, análisis de ICS y perfil de isotipo de anticuerpos) que la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta Th1 predominantemente, lo que mitiga la preocupación por la enfermedad potenciada por la vacuna conducida por Th2 e indica un nivel potencialmente protector de respuesta inmune inducida. por vacunación.

Se vacunó a 98 adultos sanos de entre 18-55 años con 5 x 10^{10} partículas virales de la vacuna candidata ChAdOx1 nCov-19 como parte de un ensayo clínico de fase I/II. Se recolectaron muestras de sangre el día de la vacunación y 7, 14, 28 y 56 días después de la vacunación. Diez vacunados recibieron una segunda dosis de la misma vacuna cuatro semanas después (día 28) y se recolectaron muestras de sangre adicionales los días 35 y 42 en estos participantes.

Las células inmunes adaptativas e innatas se activan y proliferan después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 con secreción de citocinas sesgada por Th1.

Se aplicó un enfoque imparcial para medir los cambios celulares y fenotípicos generales inducidos después de la vacunación en los días 7, 14, 28 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 (figura 39a-e).

Se realizó el análisis de citometría de flujo de poblaciones inmunes discretas en PBMC congeladas no estimuladas. El análisis combinado de tSNE de 26 voluntarios vacunados con ChAdOx1 nCoV-19 formó poblaciones discretas de células T, células NK y células B el día 0 y

los días 7, 14 y 28, lo que indica cambios fenotípicos en estas poblaciones de células después de la vacunación. Dentro de estos grupos, se identificaron distintas poblaciones de células proliferantes (Ki-67$^+$) o activadas (CD69$^+$) (figura 39b-e). Las poblaciones de células activadas se agruparon notablemente en poblaciones de células B de IgG$^+$, poblaciones de células T CD4$^+$ y poblaciones de células NK.

Las células B, especialmente la población de células B de IgG$^+$, regularon positivamente el marcador de proliferación celular Ki-67 en todos los puntos de tiempo posteriores a la vacunación (figura 39f y g). Dentro de la población total de células B, el cambio distintivo hacia un fenotipo activado alcanzó su punto máximo en el día 7 al día 28, y para la población de células B de IgG$^+$ en los días 7-14 (figura 39f y g).

Las células T CD4$^+$ tenían una expresión aumentada del marcador de activación CD69 en los días 7 a 28 después de la vacunación y una tendencia hacia una expresión aumentada de Ki-67 en los días 7 y 14 después de la vacunación (figura 39f y g). Las células T CD8$^+$ expresaron un patrón similar de expresión de Ki-67 y CD69 entre los días 7 y 28 después de la vacunación (figura 39f y g). No hubo aumento en la expresión de los marcadores de diferenciación terminal CD57 y KLRG1 en células T CD8$^+$ tras la vacunación, lo que indicaría una reducción en la capacidad citotóxica tras la vacunación[32]. Después de la estimulación con péptidos, también se observó un aumento en la producción de TNFα e IFNγ por las células T CD4$^+$ en el día 14 (figura 39h). Estos marcadores de activación son típicos de una respuesta conducida por Th1. Un patrón similar de expresión

de Ki-67 y CD69 entre los días 7 y 28 después de la vacunación (figura 39f y g). No hubo aumento en la expresión de los marcadores de diferenciación terminal CD57 y KLRG1 en células T $CD8^+$ tras la vacunación que, si se encontraran, indicaría una reducción en la capacidad citotóxica tras la vacunación. Después de la estimulación con péptidos, también se observó un aumento en la producción de TNFα e IFNγ por las células T $CD4^+$ en el día 14 (figura 39h). Estos marcadores de activación son típicos de una respuesta conducida por Th1.

Las células NK pueden provocar una respuesta citotóxica a las infecciones virales y en respuesta a la vacunación. Se ha demostrado aquí que después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 el porcentaje de células NK $CD56^+CD16^+$ y $CD56^{++}CD16^-$ combinadas aumentó ligeramente en los días 7 y 14 después de la vacunación y que la expresión de Ki-67 por las células NK aumentó de manera constante a un pico en el día 28 (figura 39f). No hubo cambios significativos en la expresión de CD57, indicando diferenciación terminal, o el receptor de activación NKG2C.

Se realizó un análisis de citocinas multiplex el día 7 después de la vacunación después de la estimulación específica de antígeno de PBMC. De los nueve análisis de citocinas, cinco (IL1β, IL12, IL4, IL13 y IL8) no mostraron diferencias en los niveles de expresión después de la estimulación. La secreción de IFNγ e IL2 aumentó significativamente en los vacunados con ChAdOx1 en comparación con los controles ($p < 0.0001$ y $p = 0.0003$ respectivamente, prueba de Mann-Whitney) con un modesto aumento en TNFα ($p = 0.09$, prueba de Mann-Whitney. Los niveles de IL4 e IL13 no aumentaron en los vacunados con

ChAdOx1 después de la estimulación de PBMC (p> 0.05 para ambos), pero se midió un aumento modesto en IL10 (p = 0.005). La magnitud de la secreción de citocinas medida en los vacunados con ChAdOx1 fue mayor para IFNγ (mediana 36.4 pg/ml, rango intercuartílico [IQR] 15-67) e IL2 (mediana 10.7 pg/ml, IQR 1.7-22) que para IL10 (mediana 1.4 pg/ml, IQR 0.9-2.6), lo que indica un fuerte sesgo hacia la secreción de citocinas Th1 (figura 39i).

Las respuestas inmunes frente a ChAdOx1 nCoV-19 no difieren según el sexo

Las pacientes con COVID-19 muestran una activación de células T más robusta que los pacientes masculinos y una respuesta deficiente de las células T se correlaciona negativamente con la edad de los pacientes, que se asoció con un peor resultado de la enfermedad en los pacientes masculinos. También se ha demostrado previamente que las mujeres generan respuestas inmunes antivirales más fuertes. La inmunidad robusta inducida por ChAdOx1 nCOV-19 contra el antígeno pico del SARS-CoV-2, medida por ELISpot de IFNγ ex vivo y ELISA de IgG total, se informó previamente. Se ha analizado estas dos principales medidas de resultado inmunológicas por sexo y edad. No se ha encontrado diferencias de sexo en la respuesta a la vacuna después de una sola dosis de vacuna en ninguno de los puntos de tiempo medidos (p> 0.05, prueba de Mann-Whitney). No se ha detectado la asociación entre la edad y la magnitud de la respuesta inmune para ninguna de las medidas de resultado (p = 0.7, correlación de Spearman) en esta población de entre 18 y 55 años de edad.

La vacuna contra ChAdOx1 nCoV-19 induce IgM e IgA específicas del SARS-CoV-2, así como IgG después de los

regímenes de vacunación de sensibilización o sensibilización-refuerzo

Se realizó un análisis completo de isotipos (IgM, IgA e IgE) de anticuerpos de pico anti-SARS-CoV-2. Se ha incluido el análisis de IgG tal como se informó anteriormente con la inclusión de puntos de datos adicionales. Se cuantificaron las respuestas de anticuerpos específicos de picos de SARS-CoV-2 mediante ELISA estandarizado para los participantes del ensayo que recibieron la vacuna MenACWY o ChAdOx1 nCoV-19 y se muestran en la figura 40.

Las respuestas totales de IgG contra la proteína de pico fueron detectables el día 14, alcanzaron el pico el día 28 y se mantuvieron el día 56 (figura 40A; tabla 1). La vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 también generó niveles aumentados de IgM e IgA específicas de picos del SARS-CoV-2 con respuestas máximas el día 14 o el día 28, respectivamente (figura 40B y C; tabla 1).

Tal como se describió anteriormente, las respuestas totales de IgG aumentaron después de una segunda dosis de ChAdOx1 nCoV-19 administrada 4 semanas después de la primera dosis (figura 40A; tabla 1). En este subconjunto de vacunados, se detectó un pico de respuesta el día 42 después de la vacunación inicial. Las respuestas de IgM e IgA se mantuvieron a niveles similares después de la vacunación de sensibilización y refuerzo (figura 40B y C; tabla 1), sin diferencias significativas el día 56 en el grupo de sensibilización y refuerzo en comparación con el grupo de sensibilización solamente ($p = 0.767$ y $p = 0.092$, respectivamente, prueba de Mann-Whitney). Se realizó un perfil detallado de los isotipos de inmunoglobulina en muestras de plasma de pacientes convalecientes con COVID-

19. Si bien las respuestas de IgG específicas de picos de SARS-CoV-2 en estos individuos estaban en niveles similares a las de las vacunas ChAdOx-1 nCoV-19 después del régimen de refuerzo, las respuestas de IgM e IgA inducidas por la vacunación fueron en general menores que las inducidas después de una infección natural (figura 40A, B y C). Se detectaron respuestas bajas de IgE específicas de picos de SARS-CoV-2 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19, que fue similar a la medida después de la exposición natural al SARS-CoV-2.

La avidez de IgG específica de pico de SARS-CoV-2 de voluntarios que tenían una respuesta de IgG cuantificable en el día 28, se evaluó con un ELISA de desplazamiento de tiocianato de sodio. La avidez de IgG aumentó entre el día 28 (mediana 0.66, IQR 0.60-0.76; n=45) y el día 56 en el grupo de solo sensibilización (mediana 0.88, IQR 0.74-0.94; n=44) y en el grupo de sensibilización-refuerzo (día 28 mediana 0.54, IQR 0.52-0.68; n=10; día 56 mediana 0.94, IQR 0.83-1.15; n=10) (figura 40D). Aunque los valores de avidez fueron comparables en el día 56 entre ambos regímenes de vacunación, hubo un cambio mayor que el valor inicial entre los valores del día 28 y el día 56 en el grupo de estimulación inicial (media 1,58, SD 0,39; n = 10) en comparación con el grupo principal solo (media 1,30, SD 0,27; n = 44) (p = 0.0093, prueba de la t no apareada) (figura 40E). La avidez de IgG generada por una dosis de ChAdOx1 nCoV-19 el día 56, o una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 el día 35, excedió la avidez de IgG medida en muestras de pacientes convalecientes COVID-19 (mediana 0.77, IQR 0.62-0.92; n = 49).

Análisis de subclase después de la vacunación de sensibilización o de sensibilización-refuerzo con ChAdOx1 nCoV-19

Las muestras de los participantes vacunados con ChAdOx1 nCoV-19 con niveles detectables de IgG total el día 14 después de la vacunación, se analizaron para las subclases de IgG anti-picos (figura 41). Las respuestas de IgG1 e IgG3 específicas del pico del SARS-Cov-2 fueron fácilmente detectables el día 14, aumentaron el día 28 y se volvieron a un nivel similar al de lo medido el día 14 en el día 56 (Figura 41a y b; tabla 1). Si bien las respuestas de IgG3 fueron cuantificables en la gran mayoría de los vacunados (día 14 39/44; día 28 42/44 y día 56 39/44), las respuestas de IgG1 fueron cuantificables en aproximadamente la mitad de los vacunados (día 14 24/44; día 28 23/44 y día 56 22/44). Después de la vacunación de refuerzo, la mediana de la respuesta de IgG1 de los voluntarios no aumentó por encima del nivel inicial, con niveles similares en el día 56 en comparación con el grupo de solo sensibilización ($p = 0.8$; prueba de Mann-Whitney). Las respuestas de IgG3 aumentaron después de la vacunación de refuerzo y fueron significativamente más altas en D56 en comparación con el grupo de solo sensibilización ($p = 0.003$, prueba de Mann-Whitney). Los niveles medios de IgG2 e IgG4 fueron bajos en todos los grupos y momentos (figura 41 c y d). Se midió un perfil similar de IgG3/IgG1 mixto con niveles bajos de IgG2 e IgG4 en muestras de plasma convaleciente. De acuerdo con los datos informados anteriormente, las respuestas de IgG1 específicas de picos del SARS-CoV-2 estaban por debajo del límite de cuantificación en algunas muestras de plasma convalecientes (figura 41a, b, c y d). Finalmente,

analizamos la correlación entre los niveles de IgG3 y la capacidad de neutralización para los mismos vacunados, tal como se informó anteriormente (ensayo de microneutralización (MNA_{80})) demostrando una correlación entre los niveles de IgG3 y MNA_{80} (Spearman r = 0.73; 95% CI 0.51-0.86; $p < 0.001$) (figura 41e).

ChAdOx1 nCoV-19 induce una amplia respuesta de células T a las subunidades S1 y S2 del antígeno pico del SARS-CoV-2

Se midieron las respuestas de las células T mediante IFNγ ELISpot antes y después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19, alcanzando el máximo el día 14. Las respuestas se analizaron frente a 13 grupos de péptidos superpuestos (tabla S1) que abarcan la longitud del inserto del antígeno de la vacuna, que incluye las subunidades S1 y S2, y un péptido de secuencia de señal líder del activador tisular del plasminógeno (tPA) humano exógeno que anteriormente se había demostrado que mejora la inmunogenicidad candidatos a la vacuna MERS-CoV en ratones. Todos los grupos de péptidos, excepto el péptido señal tPA, provocaron una respuesta positiva (definida por la media del control negativo más 4 SD) en al menos el 25% de los participantes, lo que indica el reconocimiento de múltiples epítopos en ambas subunidades de picos. Los grupos reconocidos con más frecuencia fueron 4 y 2 que abarcan los aminoácidos 311 a 430 y 101 a 200 del dominio S1 y generaron una respuesta positiva por IFNγ ELISpot en el 88% y el 86% de los participantes, respectivamente.

Como las respuestas positivas a algunos grupos de péptidos fueron detectables en una pequeña proporción de participantes antes de la vacunación (figura 42a), las respuestas a los grupos individuales en D14 se

representaron como pliegues de cambio desde D0 (figura 42b y figura 43). Se detectaron los mayores aumentos contra los grupos 4 y 2, ambos correspondientes a la subunidad S1. Estos conjuntos provocaron una respuesta mediana de 165 SFC/106 PBMC y 124 SFC/106 PBMCS respectivamente el día 14, lo que equivale a una mediana de un cambio de 28 y 19 veces desde el nivel inicial. Se detectaron respuestas de linfocitos T en las subunidades S1 y S2, pero no se detectaron respuestas de linfocitos T a la secuencia señal de tPA en el constructo de la vacuna.

La vacunación induce una respuesta de linfocitos T CD4$^+$ sesgada por Th1 y una respuesta de linfocitos T CD8$^+$ citotóxicos contra péptidos pico del SARS-CoV-2

La citometría de flujo con tinción de citocinas intracelulares de PBMC estimuladas con péptidos que abarcan las subunidades S1 y S2 de la proteína pico del SARS-CoV-2 demostró la secreción de citocinas específicas de antígeno tanto de células T CD4$^+$ (GM del 0.1%, IC del 95% 0.08-0.13) y CD8$^+$ (0.05%, IC del 95% 0.03-0.08) 14 días después de una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19. Después de una segunda dosis, las frecuencias aumentaron tanto para las células T CD4$^+$ (GM del 0.16%, IC del 95% CI 0.1-0.24) y CD8$^+$ (0.11%, IC del 95% 0.05-0.23), aunque los aumentos no fueron estadísticamente significativos (figura 44a). Las células T CD8$^+$ expresaron el marcador de desgranulación CD107a que indica función citotóxica (GM del 0.03%, IC del 95% 0.02-0.05), que nuevamente aumentó después del refuerzo (GM del 0.05%, IC del 95% 0.015-0.14) (figura 44b). Las respuestas CD4$^+$ estaban fuertemente sesgadas hacia la secreción de citocinas Th1 (IFNγ e IL2) en lugar de Th2 (IL5 e IL13, figura 44c) y la proporción de secreción de citocinas

aumentó aún más hacia un fenotipo sesgado Th1 después del refuerzo (figura 44d). La frecuencia de células positivas a citocinas fue generalmente mayor en la población de células T $CD4^+$ que en la población $CD8^+$ y se detectaron respuestas de citocinas en el día 14 de los participantes con células T positivas antes de la vacunación y respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 (figura 44e). Cuando se evaluaron las combinaciones de citocinas, se detectaron pocas células T multifuncionales en las poblaciones $CD4^+$ o $CD8^+$ (figura 44f y g). Las respuestas estuvieron dominadas por células T que expresan citocinas individuales, particularmente linfocitos T $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ monofuncionales y la multifuncionalidad de la respuesta no se aumentó mediante refuerzo homólogo con una segunda dosis. Se detectaron algunas células T $CD4^+$ y $CD8^+$ duales positivas, que expresaban una combinación de IFNγ y TNFα.

Las Figuras para el Ejemplo 18 son tal como siguen:

Figura 39. Activación de poblaciones de linfocitos después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19.

(A-E) Análisis tSNE de poblaciones de linfocitos PBMC de 26 participantes del ensayo de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 A) Agrupación global de células inmunes en todas las muestras B-E) Análisis de población tSNE en el día 0 y los días 7, 14 y 28 después de la vacunación. Las áreas de actividad Ki-67+ (amarillo) se agrupan en células B IgG^+ (1), células NK (2) y células T $CD4^+$ (3) después de la vacunación. Análisis realizado en células no estimuladas.

(F-H) Análisis de mapa de calor de los marcadores de activación expresados por células inmunes en los días 0, 7, 14 y 28 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19. F) Expresión de Ki-67 por células B IgG^+ y células NK (dos

filas superiores), y células NK (tres filas superiores). Expresión de CD69 por células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$ (dos filas inferiores). G) Expresión de Ki-67 por células B, células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$. H) Expresión de TNFα y IFNγ por células T $CD4^+$. Análisis de la expresión de TNFα e IFNγ realizado en células estimuladas con grupos de péptidos de glicoproteína de pico con sustracción de los valores no estimulados. Todos los demás análisis se realizaron en células no estimuladas.

I. Se realizó un análisis de citocinas multiplex el día 7 después de la vacunación usando sobrenadantes después de la estimulación específica de antígeno de PBMC. El grupo ChAdOx1 nCov-19 se muestra en azul y el grupo MenACWY se muestra en rojo. Se observó una diferencia significativa entre IFNγ ($P<0.0001$), IL-2 ($P=0.0003$) y IL-10 ($P=0.0051$) Mann-Whitney. Las líneas se muestran en las barras de error de la mediana que muestran IQR.

Figura 40. Respuestas de isotipo de inmunoglobulina inducidas por la vacunación ChAdOx1 nCoV-19 o MenACWY. Los voluntarios del grupo principal recibieron una única vacuna contra ChAdOx1 nCoV-19 o MenACWY el día 0. Los voluntarios del grupo de refuerzo recibieron un ChAdOx1 nCoV-19 el día 0 y el día 28. Se muestran los datos de las muestras de plasma convaleciente (CONV) de pacientes con SARS-CoV-2 recuperados. Los símbolos CONV están coloreados según la gravedad de la enfermedad, verde - asintomático, gris - levemente sintomático, amarillo - moderadamente sintomático, naranja - severamente sintomático y rojo - críticamente sintomático. El grupo MenACWY se muestra en azul. El grupo de sensibilización de ChAdOx1 se muestra en

rojo. El grupo de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 se muestran en púrpura.

(A-C) Se cuantificaron las respuestas de anticuerpos específicos del trímero de pico del SARS-CoV-2 mediante ELISA estandarizado y se expresaron como unidades ELISA (UE). Se muestran las líneas punteadas en el límite de cuantificación de cada ensayo, cuyos detalles se proporcionan en los materiales y métodos. Las líneas se muestran en las barras de error de la mediana que muestran el IQR.

(D) Se midió la avidez de las respuestas de anticuerpos IgG específicos del trímero de pico de SARS-CoV-2 usando un ELISA de desplazamiento químico de NaSCN y expresado como una CI_{50}. Las líneas se muestran en las barras de error de la mediana que muestran el IQR.

(E) Cambio de veces de la avidez entre el día 56 y el día 28. Se muestran las líneas en la media, con barras de error que muestran el IC del 95%. La línea punteada no representa cambio en la avidez. Un valor superior a uno indica un aumento de la avidez desde el día 28 al día 56.

Tabla 18_1. Resumen de datos de anticuerpos (véase a continuación)

Niveles de inmunoglobulinas de pico del anti-SARS-CoV-2 en el suero de voluntarios (n) después de la vacunación de sensibilización o de sensibilización-refuerzo con ChAdOx1-nCoV-19, presentados como mediana con rango intercuartílico (IQR).

Tabla 18_1

Tabla 1 - Niveles de inmunoglobulinas de pico anti-Sars-COV-2 en suero

Sensibilización con ChAdOx1 nCOV-19

	IgG			IgM			IgA			IgG1			IgG3		
	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR*	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR
(UE)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)
D0	44	**1.00**	1.00-1.00	44	**14.17**	12.00-22.35	44	**12.00**	12.00-12.00						
D7	44	**1.00**	1.00-2.00	44	**19.07**	12.00-27.10	44	**12.00**	12.00-12.00						
D14	44	**103.00**	38.50-188.80	44	**44.80**	25.71-66.05	44	**26.09**	17.21-57.64	44	**30.90**	18.00-224.60	44	**46.62**	20.16-89.94
D28	44	**165.00**	105.00-336.50	44	**39.90**	26.85-73.64	44	**28.26**	14.08-47.28	44	**62.59**	18.00-504.70	44	**59.78**	33.71-123.20
D56	43	**121.00**	73.00-217.00	43	**22.85**	13.26-32.38	43	**14.23**	12.00-26.57	43	**37.98**	18.00-246.30	43	**36.62**	19.13-64.50

Sensibilización-Refuerzo con ChAdOx1 nCOV-19

	IgG			IgM			IgA			IgG1			IgG3		
	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR	n	Mediana	IQR
(UE)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)			(25%-75%)
D0	10	**1.00**	1.00-4.50	10	**12.00**	12.00-15.08	10	**12.00**	12.00-12.52						
D7	10	**1.00**	1.00-3.00	10	**12.48**	12.00-18.08	10	**12.00**	12.00-13.32						
D14	10	**137.00**	29.75-256.30	10	**37.97**	17.64-86.71	10	**20.88**	16.06-138.1	10	**18.00**	18.00-104.90	10	**64.09**	17.93-143.30
D28	10	**211.00**	135.30-376.00	10	**45.57**	18.52-97.15	10	**14.59**	12.57-152.8	10	**18.00**	18.00-262.00	10	**110.80**	32.87-219.80
D35	10	**821.00**	538.30-1419.00	10	**43.50**	24.13-74.48	10	**31.70**	16.86-112.30	10	**19.66**	18.00-1040.00	10	**167.50**	58.04-246.60
D42	9	**997.00**	598.00-1338.00	9	**24.24**	16.98-86.69	9	**22.40**	14.64-49.12	9	**18.00**	18.00-876.90	9	**186.00**	58.04-241.00
D56	10	**639.50**	349.30-860.80	10	**17.86**	14.47-36.16	10	**24.52**	16.35-95.69	10	**18.00**	18.00-860.00	10	**133.50**	83.21-190.60

*IQR- Rango intercuartílico

Figura 41. Las respuestas de la subclase de IgG inducidas por una dosis única o un régimen de sensibilización-refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19.

Los voluntarios del grupo de dosis única (principal) (rojo) recibieron una vacuna contra ChAdOx1 nCoV-19 el día 0. Los voluntarios en el grupo de sensibilización-refuerzo (púrpura) recibieron una vacunación de ChAdOx1 nCoV-19 al día 0 y día 28.

(A-B) Se cuantificaron las respuestas de anticuerpos específicos del trímero de pico del SARS-CoV-2 mediante ELISA estandarizado y se expresaron como unidades ELISA (UE). Se muestran las líneas punteadas en el límite de cuantificación de cada ensayo, cuyos detalles se proporcionan en los materiales y métodos.

(C-D) Se midieron las respuestas de anticuerpos específicos del trímero de pico del SARS-CoV-2 mediante ELISA indirecto y se expresaron como DO_{405}. Los voluntarios que fueron seropositivos para IgG total el día 0 o seronegativos el día 28 fueron excluidos del análisis independientemente del estado de vacunación. Los datos muestran solo voluntarios vacunados con ChAdOx1 nCoV-19. Se muestran las líneas de puntos en el límite medio de cada ensayo. Se calcularon los cortes para cada placa según los materiales y métodos.

(A-D) Las líneas se muestran en las barras de error de la mediana que muestran el IQR. Se muestran las respuestas de las muestras de plasma convaleciente (CONV) de pacientes con SARS-CoV-2 recuperados. Los símbolos CONV están coloreados según la gravedad de la enfermedad, verde - asintomático, gris - levemente sintomático, amarillo -

moderadamente sintomático, naranja - severamente sintomático y rojo - críticamente sintomático.

(E) Relación entre los datos del ensayo de microneutralización (MNA IC80) y los niveles de IgG3 e IgG1 específicos del trímero. Diagrama de dispersión de la matriz de correlación (E) y coeficiente de correlación de Spearman (media con intervalo de confianza del 95%) analizados el día 28.

Figura 42: Respuestas de IFNγ ELISPOT a grupos de péptidos de 15 meros que cubren la vacuna ChAdOx1-nCOV19

(A) Respuesta total a S1 y S2 (suma de 6 conjuntos de péptidos cada uno) en D0 y D14 después de la vacunación. Las barras muestran la mediana de SFC por millón de PBMC con barras de error que representan el IQR. La línea discontinua representa el límite inferior de detección del ensayo (48 SFC). (B) Mapa de calor de pliegues de cambio en SFC para cada grupo de péptidos para cada participante desde el inicio (D0) hasta D14 después de la vacunación. Solo se muestran los datos de las personas vacunadas con ChAdOx1.

Figura 43: Cambio de veces en SFC para cada grupo de péptidos para cada participante vacunado con ChAdOx1 desde el inicio (D0) hasta D14 después de la vacunación. Los círculos muestran el cambio de pliegue mediano con barras que representan IQR.

Figura 44. Respuestas de las células T a los péptidos de pico del SARS-CoV-2 medidas por citometría de flujo con tinción de citocinas intracelulares.

(A) Frecuencia de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan IFNγ, IL2 o TNFα 2 semanas después de la dosis de sensibilización o refuerzo (n = 7). Los círculos

representan participantes individuales y las líneas son medios geométricos. (B) Frecuencia de células T CD8+ que expresan CD107a+ a 2 semanas después de la dosis de sensibilización o refuerzo. (C) Frecuencia de secreción de citocinas Th1 y Th2 por células T CD4+ 2 semanas después de una dosis (n = 36). (D) Razón de secreción de citocinas Th1 a Th2 a las 2 semanas después de la primera o segunda dosis. (E) Frecuencia de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan citocinas individuales relevantes. Las líneas punteadas muestran el límite inferior de detección (LLD). (F) y (G) Expresión de combinaciones de citocinas de linfocitos T CD4+ (F) y CD8 + (G). En todos los paneles, n = 39 participantes tras la sensibilización-y n = 7 tras el refuerzo. Solo se muestran los datos de las personas vacunadas con ChAdOx1.

Discusión

Se ha descrito aquí, en detalle, el perfil de expresión de citocinas de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ y la composición de la subclase IgG de la respuesta de anticuerpos a la vacuna ChAdOx1 nCoV-19. Se observa una fuerte activación y proliferación de células B después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 y los anticuerpos anti-IgA e IgG contra la proteína de pico del SARS-CoV-2 se detectan fácilmente en los sueros de voluntarios vacunados con ChAdOx1 nCoV-19. La producción temporal de subclases de anticuerpos fue similar a la informada por pacientes con COVID-19 y esta última se asemeja a una infección viral típica con respuestas tempranas de células B extrafoliculares de corta duración seguidas de reacciones del centro germinal y respuestas de células B de memoria de larga duración. Las respuestas de IgG anti-pico en el pico de la respuesta después de la

vacunación muestran una respuesta de IgG1 polarizada que es consistente con los anticuerpos adquiridos naturalmente contra el SARS CoV-2. El aumento de IgG3 después del refuerzo sugiere que esta subclase puede respaldar el aumento funcional en los títulos de anticuerpos neutralizantes. Producida temprano después de las infecciones virales, la IgG3 coordina múltiples funciones efectoras de anticuerpos, que son cruciales para una rápida eliminación y pueden contribuir a la recuperación después de la infección por SARS-CoV-2. Una respuesta mixta de IgG1 e IgG3, con niveles bajos de IgG2 en un subconjunto de voluntarios e IgG4 poco detectable está de acuerdo con informes publicados anteriormente que describen la inducción de subclases de IgG humanas de tipo Th1 (IgG1 e IgG3) después de la sensibilización adenoviral. Patología compatible con enfermedad potenciada por vacuna y en un caso se demostró potenciación de la infección (ADE) dependiente de anticuerpos en modelos animales para algunos candidatos a vacuna SARS-CoV-1, y existe la preocupación de que se pueda inducir una respuesta patológica similar en humanos después de la vacunación contra SARS-CoV-2. La enfermedad potenciada por la vacuna da como resultado un aumento en la gravedad de la enfermedad cuando los sujetos vacunados se exponen posteriormente o se desafían con virus naturales. Varios estudios preclínicos de vacunas candidatas contra el SARS-CoV-1 en el modelo de ratón, hurón y primate no humano (NHP) informaron un aumento de la enfermedad cuando se expusieron los animales vacunados a virus vivos. El fenómeno recuerda la enfermedad observada con el desarrollo temprano de una vacuna contra el virus respiratorio sincitial (VSR), en la que la patología se

asoció con una alta proporción de anticuerpos no neutralizantes frente a anticuerpos neutralizantes, un papel de los neutrófilos, eosinófilos y predominantemente una respuesta sesgada Th2. La enfermedad potenciada por la vacuna difiere de la ADE y la impresión o el pecado original antigénico (OAS). El primer fenómeno puede ocurrir después de una infección por flavivirus o vacunación y el último se observa fácilmente después de una infección recurrente por influenza. Se asoció la vacunación con una vacuna vectorizada por MVA que expresa la proteína de pico del SARS-CoV-1 con ADE en el modelo de infección de hurón. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes inducidas por la vacunación fueron bajas y se ha demostrado que los anticuerpos que pueden neutralizar a un título alto pueden dar como resultado ADE a un título bajo. A diferencia, los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos después de la primera dosis de ChAdOx1 nCoV-19 son altos, aumentan aún más después de una segunda dosis y dan como resultado una enfermedad reducida en los NHP vacunados y expuestos. Se ha demostrado claramente la capacidad relativa de las vacunas adenovirales y vectorizadas por MVA para cebar anticuerpos neutralizantes frente al antígeno codificado por Anywaine *et al*, lo que sugiere que las vacunas vectorizadas por MVA frente a SARS-CoV-2 pueden implementar mejor como la segunda parte de un heterólogo régimen de sensibilización-refuerzo. También será importante investigar regímenes alternativos de sensibilización-refuerzo usando tecnologías que sean escalables de manera rápida y sostenible, incluyendo los regímenes de sensibilización-refuerzo adenovíricos heterólogos.

ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta amplia y robusta de células T a ambas subunidades del antígeno S y la funcionalidad de la respuesta de células T observada aquí es similar en fenotipo a las observadas con otros vectores adenovirales de replicación deficiente con respuestas dominadas por células T individuales que secretan una, en lugar de múltiples, citocinas. Si las células T monofuncionales o polifuncionales inducidas por la vacuna tienen un mayor valor protector parece variar según la enfermedad y no está claro para la infección por SARS-CoV-2 y COVID-19. El análisis de la secreción de citocinas después de la estimulación con péptidos de PBMC demostró que la secreción de IFNγ e IL2 aumentaba en los vacunas de ChAdOx1 en comparación con los controles y, de manera importante desde una perspectiva de seguridad, los niveles de IL4 e IL13 no aumentaron. La fenotipificación mediante análisis de citometría de flujo demostró que las respuestas de $CD4^+$ estaban sesgadas hacia la secreción de citocinas Th1 (IFNγ, IL2 y TNFα) en lugar de Th2 (IL5 e IL13). Se ha observado el sesgo hacia la secreción de citocinas de tipo Th1 por las células T inducidas por la vacuna también se ha informado con otras vacunas candidatas en ensayos clínicos que utilizan una variedad de tecnologías de vacunas. De manera importante se ha demostrado con varias metodologías (perfiles de citocinas multiplex, análisis ICS y perfiles de isotipos de anticuerpos) que la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta predominantemente Th1 y la aplicación de estos enfoques sutilmente diferentes permite resaltar los matices dentro de las respuestas de las células T.

Un aspecto importante en la epidemiología de la enfermedad COVID-19 es la marcada diferencia en las tasas de mortalidad por enfermedad entre hombres y mujeres, a pesar de tasas de casos similares. Por tanto, se han desagregado los datos para las medidas de resultado inmunológicas clave en estos estudios y no se han demostrado diferencias en la magnitud de las respuestas de anticuerpos IgG celulares o totales entre participantes masculinos y femeninos o con el aumento de la edad. Será importante seguir analizando datos desagregados en diferentes etnias, diferentes grupos de edad y también para la evaluación de la durabilidad de la respuesta inmune, teniendo en cuenta las comorbilidades que pueden influir aún más en la inmunidad inducida por vacunas.

Aunque no existen correlatos inmunitarios definidos de protección contra COVID-19, en general, se acepta extrapolando de estudios en animales, que los anticuerpos neutralizantes de títulos altos, con una respuesta de células T citotóxicas robustas $CD8^+$ y una respuesta efectora $CD4^+$ sesgada Th1 serán óptimos para inmunidad después de la exposición al SARS-CoV-2. La adición de un componente celular a una vacuna inductora de anticuerpos es atractiva cuando se desconocen los correlatos inmunitarios de una enfermedad y la inducción de una respuesta de células T $CD8^+$ citotóxicas como se describe aquí es un complemento útil para la inducción de anticuerpos neutralizantes. La determinación del umbral y el fenotipo precisos de las respuestas inmunitarias asociadas con la protección será importante para establecer un puente entre las poblaciones y las vacunas en caso de que alguna de estas vacunas demuestre una eficacia útil contra una

infección o enfermedad. La inmunofenotipificación detallada de la inmunidad inducida por la vacuna que se describe aquí demuestra una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular después de una sola dosis, caracterizada por una respuesta dominada por Th1.

Procedimientos de estudio y procesamiento de muestras

En el presente documento se analizaron todos los detalles sobre la realización del ensayo controlado aleatorio de fase I/II de ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222), incluyendo el protocolo del ensayo. Se registró este estudio en ISRCTN [15281137] y ClinicalTrials.gov, NCT04324606.

En los momentos para los análisis inmunológicos, se tomaron muestras de sangre en tubos de recolección simples y heparinizados. Se procesaron las muestras en el plazo de las 4 horas de la extracción de sangre. Se procesaron los tubos planos para la recolección de suero sanguíneo. Se centrifugaron los tubos a 1800 rpm durante 5 minutos y se colectaron el suero durante el almacenamiento a -80°C hasta que se requirió. Se procesaron tubos heparinizados para la recolección de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y plasma sanguíneo mediante centrifugación en gradiente de densidad. Se decantó la sangre en tubos Leucosep (Greiner Bio-One) que contenían Lymphoprep (STEMCELL Technologies) y se centrifugó a 1000 x g durante 13 minutos sin el freno. Se recogió una fracción de plasma sanguíneo y se almacenó a -80°C, mientras que la muestra restante se decantó en un tubo Falcon nuevo y se rellenó con medio R0 (medio de cultivo celular RPMI-1640 que contenía penicilina/estreptomicina al 1% y L-glutamina 2 mM (todos Sigma-Aldrich). Se centrifugaron las muestras de nuevo a 1800 rpm durante 5 minutos, se vertió el

sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular una vez más en R0 para lavarlo. Después de la centrifugación, el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio R10 (RPMI-1640 que contenía penicilina/estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM y suero de ternera fetal al 10% (FCS, Labtech Intl.) para el recuento.

Se contaron las células usando un CasyCounter (OMNI Life Science) para su uso en ensayos recientes o para criopreservación. Los ensayos realizados en células frescas fueron ELISPOT y tinción con citocinas intracelulares únicamente (descrito a continuación). Se congelaron todas las células restantes a una concentración de 8-12 x 10^6 PBMC por ml. Tras la centrifugación (1800 rpm, 5 min) se resuspendieron las células en FCS frío a la mitad del volumen total de congelación. Se colocaron las células en un frigorífico (2-8°C) durante 20 minutos antes de añadir un volumen igual de FCS frío que contenía dimetilsulfóxido al 20%. Se prepararon alícuotas de 1 ml y se transfirieron rápidamente a CoolCells (Corning) para congelarlas a -80°C durante la noche. A continuación, se transfirieron los tubos a un congelador de temperatura ultrabaja a -150°C hasta que se requirieron.

Se obtuvieron muestras de plasma de convalecencia de adultos (≥18 años) con infección por SARS-CoV-2 positiva por PCR de pacientes ingresados en el hospital o de la vigilancia de los trabajadores de la salud, todos los cuales estaban inscritos en estudios clínicos (Enfermedad gastrointestinal en Oxford: Subestudio COVID [Referencia del Comité de Ética de Investigación de Sheffield 16/YH/0247], Protocolo de caracterización clínica de ISARIC/OMS para infecciones emergentes graves [Comité de

Ética de Investigación de Oxford C referencia 13/SC/0149], y Proyecto de Inmunomia de Sepsis [Comité de Ética de Investigación de Oxford C, referencia 19/SC/0296]) Para cada ensayo se evaluó a los participantes asintomáticos y sintomáticos. Se analizaron diferentes muestras en los ensayos, según la disponibilidad de la muestra, la capacidad del laboratorio y los requisitos específicos del ensayo. Cuando se dispuso de múltiples muestras longitudinales para el mismo participante, en los análisis de este artículo solo se incluye un punto temporal y se seleccionó el punto temporal más temprano (al menos 20 días después de los síntomas iniciales).

Péptidos y estimulaciones

Se sintetizaron péptidos que abarcan toda la longitud de la secuencia de la proteína de pico del SARS-CoV-2 para su uso en ensayos de células T específicas de antígeno (Proimmune Ltd.). Se sintetizaron un total de 253 péptidos como 15-meros superpuestos por 10 aminoácidos.

También se sintetizaron péptidos para la secuencia líder del activador tisular del plasminógeno (tPA) N-terminal que se incluye para aumentar la expresión del antígeno de la vacuna del vector adenoviral. Péptido 1 empezó en la posición del aminoácido 1 y tenía la secuencia MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO: 19); Péptido 2 empezó en la posición del aminoácido 6 y tenía la secuencia VLLPLVSSQCVNLTT (SEQ ID NO: 20); Péptido 3 empezó en la posición del aminoácido 11 y tenía la secuencia VSSQCVNLTTRTQLP (SEQ ID NO: 21) y así sucesivamente. Los péptidos 254 a 258 se superpusieron a 15 meros de la misma manera, pero con la secuencia de tPA. . En resumen, para el ensayo de citometría de flujo Cytek™ Aurora, el ensayo de perfil de citocinas MSD

Th1/Th2 y la tinción de citocinas intracelulares, se hicieron dos grupos de péptidos separados que abarcan las subunidades S1 (134 péptidos) y S2 (119 péptidos) de la proteína de pico del SARS-CoV-2. Para el ensayo ELISPOT, se prepararon 12 grupos de entre 18-24 péptidos que constan de 6 grupos cada uno para las subunidades S1 y S2. En este ensayo se incluyó un grupo de secuencia líder de tPA separado (5 péptidos). Pool1: S1 – péptidos 1 a 20; grupo 2: (S1) – péptidos 21-40; grupo 3 – péptidos 41 a 62; grupo 4 – péptidos 63 a 86; grupo 5 – péptidos 87 a 110; grupo 6 – péptidos 111 a 134; grupo 7: S2 – péptidos 135 a 154; Grupo 8: (S2) – péptidos 155 a 174; Grupo 9 – péptidos 175 a 195; Grupo 10 – péptidos 196 a 215; Grupo 11 – péptidos 216 a 235; grupo 12 – péptidos 236 a 253; grupo de tpa (5 péptidos – péptidos 254-258).

Citometría de flujo realizada en el analizador espectral Cytek Aurora

Se realizó citometría de flujo a partir de alícuotas congeladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 30 donantes a partir de los días 0, 7, 14 y 28 después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV19 (n=26). Se descongelaron las células en medio que contenía> 5 U/ml de benzonasa y se resuspendieron en medio RPMI completo complementado con FCS al 10%, L-glutamina y penicilina/estreptomicina a una concentración de 2 x 10^7 células/ml. Se sembraron 2x10^6 PBMC por pocillo en una placa de 96 pocillos y se estimularon con péptidos sintéticos que abarcaban la proteína de pico del SARS-CoV-2 dividida en dos conjuntos separados para las subunidades S1 y S2 (tabla S2) a una concentración final de 2 µg/ml o los medios como control. Se estimuló un pocillo por donante con

Phorbol 12-miristato 13-acetato e ionomicina (Cell Activation Cocktail, BioLegend) como control positivo. Se coestimularon las PBMC en presencia de CD28 antihumano, CD49d (1 µg/mL, Life Technologies Ltd), y CD107a-BV785 (BioLegend) durante dos horas a 37°C con CO_2 al 5% , y luego se incubaron durante 16 horas adicionales tras la adición de Brefeldin A 1 µg/mL y Monensina a cada pocillo (BioLegend).

Se lavaron las PBMC en tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato con albúmina de suero bovino al 0.5% y EDTA al 1%) y se tiñeron con un cóctel de anticuerpos de superficie incluyendo Live/Dead-Zombie UV, CD4-AF700, CD19-Spark NIR 685, CD56-APC, CCR7-PerCP/Cy5.5, PD1-PE/Dazzle 594, CD57-PE/Cy7(BioLegend) CD8-AF405, CD45RA-SuperBright 702, CD27-PerCP eF710, CD20-AF532 (ThermoFisher Scientific) CD16-BUV495, CD3-BUV661, CD138-BUV805, NKG2A-BV480, IgM-BB515 (BD Biosciences), NKG2C-PE, KLRG1-VioBlue (Miltenyi) anti humanos en tampón FACS con tampón de tinción brillante Plus al 10% (BD Biosciences). Se incubaron las PBMC a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos, luego se lavaron dos veces en tampón FACS. Luego, se incubaron las PBMC en disolución CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos, luego se lavaron dos veces en tampón Perm/Wash y luego se tiñeron con un cóctel de anticuerpos intracelulares incluyendo: IFNγ-BV650, IL2-BV605 (BioLegend), IgG-BV421, TNFα-BUV395, CD69-BV750, CD71-BUV563, CD25-BV737 (BD Biosciences) Ki67-APC eF780 (ThermoFisher Scientific) antihumanos en Perm/Wash. Se incubaron las PBMC a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos, se lavaron dos veces en tampón Perm/Wash, una vez en tampón FACS, luego se resuspendieron en 200 µL de tampón

FACS para la adquisición en un analizador espectral Cytek Aurora de cuatro láser personalizado usando SpectroFlo v2.2 (Cytek biosciences).

Se calculó la compensación de un solo fluorocromo en perlas (BD Biosciences, Miltenyi) o PBMC humanas. Se realizó el análisis de los datos en FlowJo (v10.6.2) mediante una estrategia de activación jerárquica (figura S6) y Prism 8 (GraphPad). Se calcularon las respuestas específicas de péptido restando los controles no estimulados de las muestras estimuladas con péptido.

Perfiles de MSD –Th1/Th2 citocina

Se midieron las respuestas de citocinas Th1/Th2 en sobrenadantes de cultivo de tejidos a partir de la estimulación de PBMC con péptidos sintéticos que cubren la proteína de pico. Se resuspendieron $5x10^5$ PBMC recién aisladas en 250 µl de medio R10 en placas de fondo en U de 96 pocillos y se complementaron con 1 µg/ml de CD28 anti-humano y Cd49d. Se añadieron péptidos que abarcan las subunidades S1 y S2 de la proteína de pico de SARS-CoV-2 (tabla S1) a pocillos independientes a una concentración de 2 µg/ml. Cada muestra también incluye un control no estimulado (solo medios). Después de una incubación de 16 - 18 horas a 37°C con CO_2 al 5%, se sedimentaron las células mediante centrifugación (1800 rpm, 5 min) y se recogieron 200 µl de sobrenadante. Se combinaron los sobrenadantes de las estimulaciones S1 y S2 y se almacenaron a −80°C hasta que se requirieron.

Se analizaron las respuestas de citocinas usando el kit de panel 1 de citocinas proinflamatorias (humano) V-plex de MSD (Meso Scale discovery), validado por MSD. Se recubre cada placa con 9 mAbs de captura diferentes contra 9

citocinas diferentes dispuestas en puntos independientes en la base de cada pocillo. Se asocian las citocinas IFN-y, IL1b, IL-2, IL4, IL8, IL10, IL-12p70, IL13 y TNFa con una respuesta de células T de tipo Th1 o Th2.

Se diluyeron los sobrenadantes 1:2 para la muestra no estimulada y 1:10 para la muestra estimulada S1/S2 usando el diluyente 2 de MSD. El kit proporciona un calibrador liofilizado multianalito que, una vez reconstituido, se utilizará en la curva estándar utilizando una dilución en serie de 4 veces para formar una curva estándar de 8 puntos en placa por duplicado. Se llevaron a cabo las mediciones de citocinas según las instrucciones del fabricante. Se leen las placas en el lector MSD en 15 minutos después de añadir el tampón de lectura.

Se analizaron los datos usando MSD discovery workbench 4.0. Se repitieron las muestras si cualquier muestra era una réplica con un coeficiente de variaciones (CV) superior al 20%. Se leyeron las réplicas de la curva estándar, se multiplicaron por el factor de dilución y la concentración se informó como un promedio de las réplicas en pg/ml. Se restó la concentración de la muestra no estimulada de la concentración de la estimulada (resta anterior). Se han reemplazado los valores negativos de la resta anterior por ceros. Se ha añadido un valor arbitrario de 0.0001 a las restas anteriores en todas las muestras para superar la presencia de valores nulos obtenidos de muestras demasiado bajas para leerse en la curva estándar.

ELISA estandarizado de isotipo y subclase

Se detectó IgG total específica de antígeno usando un ELISA indirecto interno usando proteína de pico de SARS-CoV-2 trimérica, tal como se describió anteriormente.

Se usó ELISA estandarizado para cuantificar las respuestas de IgG1, IgG3, IgA e IgM específicas del pico de SARS-CoV-2 circulante. Se recubrieron las placas Nunc MaxiSorp™ ELISA (ThermoFisher Scientific) durante la noche (≥16 horas) a 4°C con 50 µL por pocillo de 5 µg/ml de proteína de pico trimérico de longitud completa (FL-S) del SARS-CoV-2 (The Jenner Institute , Universidad de Oxford) diluido en PBS. Un constructo de proteína soluble SARS-CoV-2 FL-S (GenBank MN908947 Wuhan-Hu-1) que codifica los residuos 1-1213 con dos conjuntos de mutaciones que estabilizan la proteína en una conformación previa a la fusión (eliminación de un sitio de escisión de furina e introducción de dos residuos de prolina; K983P, V984P) se expresó tal como se describe [62]. Se retuvo el péptido señal viral endógeno en el extremo N terminal (residuos 1-14), un dominio de pliegue T4 C-terminal incorporado para promover la asociación de monómeros en trímeros para reflejar la proteína viral transmembrana nativa, y una etiqueta His6 C-terminal incluido para la purificación por afinidad a base de níquel. FL-S se expresó de manera transitoria en Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) y la se purificó proteína a partir de sobrenadantes de cultivo por afinidad de metal inmovilizado seguido de filtración en gel en solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7.4.

Se lavaron las placas 3x con PBS/Tween (0.05%) (PBS/T) y se secaron con golpecitos. Se bloquearon las placas durante 1 hora con 100 µL por pocillo de Caseína Blocker™ en PBS (ThermoFisher Scientific) a 20°C. Se diluyeron las muestras de prueba en tampón de bloqueo (dilución mínima de 1:50) y se añadieron 50 µL por pocillo a la placa por triplicado. Para cada isotipo o subclase de inmunoglobulina que se está

sometiendo a prueba, el suero de referencia respectivo (elaborado a partir de una combinación de suero de donante de título alto) se diluyó en tampón de bloqueo en una serie de diluciones al doble para formar una curva estándar de 10 puntos. Se realizaron 3 diluciones independientes del suero de referencia (con un factor de dilución correspondiente al 4° punto de la curva estándar) para servir como controles internos. Se añadieron la curva estándar y los controles internos a la placa a 50 µl por pocillo por duplicado. Se incubaron las placas durante 2 horas a 37ºC con agitación de 300 rpm y luego se lavaron 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se diluyó el anticuerpo secundario en tampón de bloqueo y se añadieron 50 µl por pocillo. El anticuerpo secundario usado dependía de la subclase o isotipo de inmunoglobulina que se detectaba: Estos fueron Bisagra-AP IgG1 anti-humana de ratón, Bisagra-AP IgG3 anti-humana de ratón, IgA-AP anti-humana de cabra e IgM-AP anti-humana de cabra. (Southern Biotech). Se incubaron las placas durante 1 hora a 37 ºC con agitación de 300 rpm. Se lavaron las placas 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se añadieron 100 µL por pocillo de sustrato de fosfatasa alcalina PNPP (ThermoFisher Scientific) y se incubaron las placas durante 1-4 horas a 37ºC con agitación de 300 rpm. Se midió la densidad óptica a 405 nm (DO_{405}) usando un lector de absorbancia ELx808 (BioTek) hasta que el control interno alcanzó una DO_{405} de 1. Se usó el recíproco de la dilución de control interno que da una DO_{405} de 1 para asignar un valor de unidad ELISA (UE) del estándar. Se utilizó el software Gen5 ELISA v3.04 (BioTek) para convertir la DO_{405} de las muestras de prueba en UE mediante la interpolación del rango lineal de la curva estándar

ajustada a un modelo logístico de 4 parámetros. A todas las muestras con una DO_{405} por debajo del rango lineal de la curva estándar en la dilución mínima probada se les asignó una UE mínima de acuerdo con el límite inferior de cuantificación del ensayo.

Isotipo y subclase de ELISA de DO

Se detectaron respuestas de IgG2, IgG4 e IgE específicas de antígeno en ausencia de un control de suero específico de antígeno. Se recubrieron placas de ELISA Nunc MaxiSorp™ (ThermoFisher Scientific) con 50 µl por pocillo de 5 µg/ml de proteína de pico trimérico SARS-CoV-2 (The Jenner Institute, Universidad de Oxford). Se recubrieron las placas también con una concentración específica de un control de inmunoglobulina humana comercial: Lambda IgG2 humana recombinante, Lambda IgG4 humana recombinante e IgE Lambda humana recombinante (Bio-Rad Laboratories Ltd). Se dejaron las placas durante la noche (≥16 horas) a 4 °C. Se lavaron las placas 3x con PBS/Tween (0.05%) (PBS/T) y se secaron con golpecitos. Se bloquearon las placas durante 1 hora con 100 µL por pocillo de Caseína Blocker™ en PBS (ThermoFisher Scientific) a 20°C. Se diluyeron las muestras de prueba y 5 muestras de control negativo prepandémicas 1:50 en tampón de bloqueo y se añadieron 50 µL a pocillos recubiertos con antígeno por duplicado. Se añadieron 50 µL de tampón de bloqueo a pocillos recubiertos con inmunoglobulina y pocillos en blanco. Se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C con agitación de 300 rpm y luego se lavaron 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se diluyó el anticuerpo secundario en tampón de bloqueo y se añadieron 50 µl por pocillo. El anticuerpo secundario usado dependía de la subclase o isotipo de inmunoglobulina

que se detectaba: Fd-AP IgG2 antihumana de ratón, Fc-AP IgG4 antihumana de ratón y Fc-AP IgE antihumana de ratón (Southern Biotech). Se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C con agitación de 300 rpm. Se lavaron las placas 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se añadieron 100 µL por pocillo de sustrato de fosfatasa alcalina PNPP (ThermoFisher Scientific) y se incubaron las placas durante 1-4 horas a 37°C con agitación de 300 rpm. Se midió la densidad óptica a 405 nm (DO_{405}) usando un lector de absorbancia ELx808 (BioTek) hasta que el control de inmunoglobulina alcanzó una DO_{405} especificada. Se calcularon los puntos de corte negativos usando la fórmula Media + 7,858*SD de las lecturas de DO_{405} de las muestras de suero de control negativo prepandémicas, donde 7.858 es el multiplicador de SD con un nivel de confianza del 99.9% para n=5 controles.

ELISA de avidez

Se evaluó la avidez del anticuerpo IgG total específico del pico anti-SARS-CoV-2 del suero del donante mediante ELISA de desplazamiento con tiocianato de sodio (NaSCN). Se recubrieron las placas Nunc MaxiSorp™ ELISA (ThermoFisher Scientific) durante la noche (≥16 horas) a 4°C con 50 µL por pocillo de 2 µg/ml de proteína de pico trimérico del SARS-CoV-2 (The Jenner Institute, Universidad de Oxford) diluido en PBS. Se lavaron las placas 3x con PBS/Tween (0.05%) (PBS/T) y se secaron con golpecitos. Se bloquearon las placas durante 1 hora con 100 µL por pocillo de Caseína Blocker™ en PBS (ThermoFisher Scientific) a 20°C. Las muestras de prueba, y una reserva de suero del control positivo , se han diluido en tampón de bloqueo para normalizarlas a una DO_{405} de 1 y se añadieron 50 µL por

pocillo por duplicado a cada fila de la placa (excepto la última fila donde solo se añadió tampón de bloqueo). Se incubaron las placas durante 2 horas a 20°C y luego se lavaron 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se añadieron concentraciones crecientes de NaSCN (Sigma-Aldrich) diluido en PBS a 50 µL por pocillo a cada fila hacia abajo de la placa (1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M) excepto para la primera y última fila donde solo se añadió PBS. Se incubaron las placas durante 15 minutos a 20°C y luego se lavaron 6x con PBS/T y se secaron con golpecitos. El anticuerpo IgG antihumana (específico de la cadena γ) - Fosfatasa Alcalina producido en cabra (Sigma-Aldrich) se diluyó 1:1000 en tampón de bloqueo y se añadieron a la placa 50 µL por pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a 20°C y luego se lavaron 3x con PBS/T y se secaron con golpecitos. Se añadieron 100 µL por pocillo de sustrato de fosfatasa alcalina PNPP (ThermoFisher Scientific) y las placas se incubaron a 20°C. Se midió la densidad óptica a 405 nm (DO_{405}) usando un lector de absorbancia ELx808 (BioTek) hasta que los pocillos de la muestra sin tratar alcanzaron una DO_{405} de 1 (0.8-2.0). Se usó el software Gen5 ELISA v3.09 (BioTek) para representar gráficamente la muestra de prueba DO_{405} frente a la concentración de NaSCN y se ajustó a los datos una función de ranura con factor de suavizado 0.001. Para cada muestra, la concentración de NaSCN requerida para reducir la DO_{405} al 50% de la sin NaSCN (IC_{50}) se interpoló a partir de esta función y se informó como una medida de avidez.

Ensayos ELISpot de IFNγ *ex vivo*

Se realizaron los ensayos ELISpot en PBMC recién aisladas antes y 14 días después de la vacunación con ChadOx1

nCoV19. Se realizaron los ensayos usando placas Multiscreen IP ELISpot (Millipore) que se recubrieron durante la noche a 4°C con 10 µg/ml de anticuerpo de recubrimiento anti-IFNγ humano (clon 1-D1K, Mabtech) en tampón de carbonato, antes de lavar 3 veces con PBS y bloquear con medio R10 durante 2-8 horas. Se añadieron 2.5 x 10^5 PBMC a cada pocillo de la placa junto con 13 conjuntos de péptidos que cubren la proteína de pico de SARS-CoV-2 y la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular N-terminal a una concentración final de 10 µg/ml (tabla S1). Se realizó cada ensayo por triplicado y se incubó durante 16 – 18 horas a 37°C con CO_2 al 5%.

A continuación, se revelaron las placas lavando 6 veces con PBS/T, seguido de la adición de 1 µg/ml de anticuerpo detector anti-IFNγ (7-B6-1-Biotina) a cada pocillo. Después de una incubación de 2 a 4 horas, se lavaron de nuevo las placas y se añadió SA-ALP 1:1000 durante 1 a 2 horas. Después de una etapa de lavado final, se revelaron las placas usando sustrato cromogénico BCIP NBT-plus (Moss Inc.)

Se contaron las placas ELISpot usando un contador ELISpot automático AID (AID Diagnostika GmbH, algoritmo C) usando configuraciones idénticas para todas las placas, y se ajustaron los recuentos solo para eliminar los artefactos. Se promediaron las respuestas a través de pocillos por triplicado y se restó la respuesta media de los pocillos no estimulados (control negativo). Se expresan los resultados como células formadoras de puntos (SFC)/10^6 PBMC. Las respuestas a un péptido se consideraron positivas si las respuestas sustraídas anteriores eran >40 SFU/10^6 PBMC. Si las respuestas fueron > 80 SFC/10^6 PBMC en el control

negativo (PBMC sin antígeno) o <800 SFC/10^6 PBMC en los pocillos del control positivo (enterotoxina estafilocócica B combinada a 0.02 µg/mL y fitohemaglutinina-L a 10 µg/mL), se excluyeron los resultados de un análisis posterior.

Tinción de citocinas intracelulares.

Se realizó la tinción de citocinas intracelulares (ICS) en PBMC recién aisladas estimuladas con péptidos S1 y S2 agrupados. Se resuspendieron 3 x 10^6 PBMC en tubos FACS de polipropileno de 5 ml a un volumen de 1 ml en medio R10 complementado con 1 µg/ml de CD28 y CD49d anti-humano y 1 µl de CD107a PE-Cy5 (eBioscience). Se añadieron grupos de péptidos S1 y S2 (tabla S1) a una concentración de 2 µg/ml. Cada muestra también incluía un control positivo (enterotoxina B estafilocócica a 1 µg/ml, Sigma Aldrich) y un control no estimulado (solo medio). Se incubaron células a 37°C con CO_2 al 5% durante 16-20 horas con Brefeldin A (3 µg/ml) y monensina (2 mM) (eBioscience) añadidos tras 2 horas.

Al final de la incubación, las células se lavaron en tampón FACS (PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0.1% y NaN_3 al 0.01%) y se transfirieron a una placa de cultivo de tejidos con fondo en U de 96 pocillos para la tinción. En primer lugar, se añadió un cóctel de tinción de superficie que contenía 2.5 µl de una dilución 1:40 de tinte Aqua Live/Dead (ThermoFisher Scientific) y 1 µl de BV711 CCR7 (Biolegend) en 46.5 µl de tampón FACS. Se incubaron las células en la oscuridad durante 20 minutos y se lavaron con tampón FACS. Se añadieron 100 µl de disolución CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) a cada pocillo y se dejó incubar durante 20 minutos adicionales. Luego se lavaron las células con tampón Perm/Wash antes de la tinción de

citocinas intracelulares. El cóctel de ICS contenía 0.025 µl de CD45RA BV605, 0.025 µl de TNF**α** PE-Cy7, 0.1 µl de IFNγ FITC, 0.025 µl de CD14 e450, 0.025 µl de CD19 e450, 0.5 µl de CD3 AF700, 1 µl de IL-2 BV650, 1.25 µl de IL-5 PE, 2.5 µl de IL-13 APC, 3.5 µl de CD4 PerCP Cy5.5 y 5 µl de CD8 APC-eF780 a un volumen total de 50 µl diluido en tampón FACS. Se tiñieron muestras en la oscuridad durante 30 minutos. Se lavaron las células dos veces con tampón perm/wash y dos veces con tampón FACS antes de resuspenderlas en 100 µl de paraformaldehído al 1%. Se prepararon los controles de compensación recién preparados para cada lote usando OneComp eBeads (eBioscience). Se mantuvieron las células en hielo y se filtraron a través de un filtro de 35 µm antes de la adquisición. Se adquirieron las células en un citómetro de flujo BD LSRFortessa de 5 láser (BD Biosciences) y se analizaron los datos en FlowJo v10.7. Se aplicó una estrategia de activación jerárquica para el análisis de muestras (se aplicó el procedimiento de control de calidad de la figura S7 A para eliminar muestras con menos de 100,000 acontecimientos en la puerta de $CD3^+$ en vivo, muestras con <1% de respuesta de citocinas a SEB ($CD4^+$ y $CD8^+$ IFNγ, $CD8^+$ TNFα). Se aplicó un límite inferior de detección y solo se incluyeron en el análisis las muestras con una respuesta ELISPOT superior a 200 SFC/10^6 PBMC).

Análisis estadísticos

Todas las pruebas estadísticas, así como toda la representación gráfica de los datos, se realizaron en GraphPad Prism 8 (excepto la gráfica de dispersión de la matriz de correlación que se generó en SPSS Statistics 25). Para comprobar la normalidad de los datos se calculó la

prueba d'Agostino-Pearson. Comparación descriptiva de los niveles de isotipo/subclase de inmunoglobulina aplicados medianas con rangos intercuartílicos (IQR); la avidez de IgG multiplica el cambio por media y desviación estándar (SD). Se compararon las muestras no apareadas mediante una prueba de la U de Mann-Whitney de 2 colas o la prueba de la t no apareada, según la distribución de los datos. Se analizaron las correlaciones usando prueba de los rangos de Spearman.

Ejemplo 19: Expresión de glicoproteína de pico de SARS-CoV-2 de tipo nativo por ChAdOx1 nCoV-19

Se infectaron células HeLa S3 con ChAdOx1 nCoV-19 y se incubaron con ACE2 recombinante o anti-ChAdOx1 nCoV-19 (derivado de ratones vacunados) y se compararon con controles no infectados, y se analizaron mediante citometría de flujo. Se observó usando citometría de flujo que ChAdOx1 nCoV-19 produce glicoproteína SARS-CoV-2 S asociada a la membrana en conformaciones nativas que pueden unirse a su receptor ACE2 del huésped.

Los tomogramas revelaron que la superficie de las células está densamente cubierta con densidades que sobresalen consistentes con el tamaño y la forma de la conformación de prefusión de la proteína SARS-CoV-2 S (Fig. 45A y 45B). Estas densidades están ausentes en las células de control no infectadas. El crioinmunoetiquetado usando sueros de ratones vacunados con ChAdOx1 nCoV-19 confirma la presentación de abundante proteína S en la superficie celular. Se ha realizado un promedio de subtomogramas de 3274 picos de superficies celulares usando emClarity. El mapa de densidad promediada tiene una resolución de 9.6 Å (con un límite de corte FSC de 0.143), lo que resuelve

claramente la estructura general de picos, que se superpone muy bien con los modelos atómicos de picos de prefusión en la bibliografía (Fig. 45C y 45D). El promediado del subtomograma, combinado con el análisis de citometría y el crio-inmunoetiquetado, confirma inequívocamente que la mayoría de las proteínas de pico en la superficie se presentan en el estado de prefusión.

Se observaron altos niveles de ocupación de glicanos en toda la proteína. Esto es especialmente importante ya que se sabe que los glicanos protegen más epítopos proteicos inmunogénicos, por lo que el vector de la invención no presenta epítopos que no se presenten durante la infección natural que pudieran desviar al sistema inmunológico de los epítopos neutralizantes accesibles.

Usando la estructura crio-EM de la proteína trimérica SARS-CoV-2 S, se ha mapeado el estado de glicosilación de la proteína S1/S2 (Fig. 46C). Se observó una mezcla de oligomanosa/híbrido y sitios de tipo complejo, con sitios de glicano como N234, que se sabe que tienen efectos estabilizadores sobre el RBD, preservando el estado predominantemente oligomanosa informado tanto en proteínas recombinantes como en virus. De manera similar, se determinó que el glicano en N165 que también estabiliza la conformación "arriba" de RBD es de tipo complejo en la proteína S que surge de la infección de células con ChAdOx1 nCoV19. Dado que los glicanos son indicadores sensibles de la arquitectura de la proteína local, es alentador que tales glicanos, que se sabe que tienen funciones estructurales, conserven su estado de procesamiento, lo que proporciona evidencia adicional de una estructura de proteína de prefusión de tipo nativo.

Resumen del Ejemplo 19: Convencionalmente, muchos candidatos a vacunas incluyen mutaciones estabilizadoras en la proteína S, de modo que la proteína mantiene la conformación de prefusión y evita el desprendimiento de S1. A diferencia, el vector viral de la invención no comprende mutaciones estabilizadoras en la proteína S.

Este ejemplo valida la estructura, glicosilación y antigenicidad de la proteína S expresada a partir del vector viral ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222. Se ha demostrado el procesamiento y el ensamblaje postraduccionales de tipo nativo, y revelamos la expresión de proteínas S en la superficie de las células que adoptan la conformación de prefusión trimérica, que es especialmente ventajosa ya que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes se dirigen a los epítopos que se muestran en el pico de prefusión. Se ha mostrado el mimetismo nativo de la funcionalidad de unión al receptor de la proteína SARS-CoV-2 S, la estructura de prefusión y el procesamiento de modificaciones de glicanos. Es una ventaja sorprendente que estas importantes propiedades similares a las nativas de la proteína S expresada se obtengan sin el uso de mutaciones estabilizadoras.

Ejemplo 20: Sujetos Envejecidos

Se ha demostrado que una sola dosis de ChAdOx1 nCoV-19 provoca una respuesta de células B y T en ratones adultos de 3 meses de edad, con la formación de células plasmáticas, centros germinales y células auxiliares foliculares T que contribuyen a la producción de anticuerpos anti-pico. Se complementa el desarrollo de la inmunidad humoral con la formación de células Th1 polifuncionales específicas de la vacuna y células T $CD8^+$.

En ratones de 22 meses de edad, una sola dosis de ChAdOx1 nCoV-19 indujo la formación de células Th1, células T $CD8^+$ reactivas a la vacuna, una respuesta del centro germinal y anticuerpos específicos de la vacuna. Sin embargo, se redujo la respuesta celular y humoral en magnitud en ratones de 22 meses en comparación con ratones adultos de 3 meses, con isotipos y subclases de anticuerpos producidos de perfil similar. La administración de una segunda dosis mejoró la respuesta del centro germinal y el título de anticuerpos en ratones envejecidos, y también aumentó el número de células T $CD8^+$ productoras de granzima B. En conjunto, esto indica que la inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19 puede mejorarse en personas mayores mediante el uso de una estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo.

La inmunización intramuscular drena el antígeno al aLN y al bazo, dando como resultado la activación de las células presentadoras de antígeno en ambos compartimentos tras la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 en ratones, que se muestra al examinar imágenes confocales de inmunofluorescencia de la expresión de DAPI y la localización de FluoSpheres™ (505/515) en el aLN y bazo de ratones inmunizados con FluoSpheres™ o PBS fluorescentes de color amarillo verdoso a las 24 horas de la inmunización intramuscular.

ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta de células plasmáticas y células B del centro germinal como se muestra en los análisis tSNE/FlowSOM de células B $CD19^+$ de ratones de 3 meses de edad (3 meses) siete días después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS.

ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta de células CD4 dominada por Th1 como se muestra en los análisis

tSNE/FlowSOM de células T $CD4^+$ de ratones de 3 meses de edad (3 meses) siete días después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS.

ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta de células T CD8 como se muestra en los análisis tSNE/FlowSOM de células T $CD8^+$ de ratones de 3 meses de edad (3 meses) siete días después de la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 o PBS.

Una estrategia de refuerzo inicial corrige la sensibilización de células T CD8 desregulada en ratones envejecidos

Para evaluar la respuesta de las células T $CD8^+$ a la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 en el contexto del envejecimiento, inmunizamos ratones de 3 y 22 meses de edad y enumeramos los tipos de células T $CD8^+$ alterados por la vacunación (en la figura 4) nueve días después de la vacunación (**Fig. 47a**). En el aLN drenante, las células T $CD8^+$ de ratones envejecidos expresaron marcadores de activación y proliferación en respuesta a ChAdOx1 nCoV-19. Pero el número de células $CXCR3^+$ o células de memoria efectoras T no aumentó en ratones envejecidos, en comparación con el número en el grupo vacunado con PBS, como se observó en ratones jóvenes. (**Fig. 47b-d**). En este punto de tiempo temprano, la vacunación ChAdOx1 nCoV-19 no alteró el número de células T de memoria central en ratones jóvenes o envejecidos. (**Fig. 47e**). En el bazo, se observaron menos células T $Ki67^+$ $CD8^+$ en ratones envejecidos después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19, en comparación con ratones adultos más jóvenes. (**Fig. 47f**). Se evaluó la formación de células T $CD8^+$ específicas de antígeno reestimulando los esplenocitos con grupos de péptidos de proteína de pico de SARS-CoV-2. Los ratones

envejecidos tenían un gran defecto en la granzima B productora de células T $CD8^+$, pero la producción de IFNγ y TNFα no se vio afectada significativamente en comparación con los ratones más jóvenes (**Fig. 47g**). La producción de IL-2 fue baja tanto en ratones adultos como envejecidos en este momento (**Fig. 47g**). A pesar de una tendencia a una menor producción de citocinas por las células T $CD8^+$ en ratones envejecidos, la proporción de células T $CD8^+$ polifuncionales no disminuyó significativamente en los ratones envejecidos después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 (**Fig. 47h**). Esto demuestra que una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 induce una respuesta de células T $CD8^+$ alterada en ratones envejecidos caracterizada por una falla en la formación de células efectoras productoras de granzima B.

Para determinar si una segunda dosis podría mejorar esta respuesta, se ha administrado una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 un mes después de la inmunización de sensibilización (**Fig. 47i**). Nueve días después del refuerzo, no se observó un aumento de las células T CD4 $Ki67^+$ en el aLN de drenaje (**Fig. 47j**), posiblemente debido a que la cinética de la respuesta secundaria es más rápida que la primaria. Se observó un aumento significativo en las células T $CXCR3^+$ $CD8^+$ y las células de memoria efectoras en ratones envejecidos después del refuerzo, sin cambios en la proporción de células de memoria central en en cualquier grupo de edad (**Fig. 47k-m**). La evaluación de esplenocitos específicos de antígeno mostró que la dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 rescató la producción de células T $CD8^+$ productoras de granzima B en ratones envejecidos (**Fig. 47n**). La producción de IFNγ y la polifuncionalidad de

citocinas son similares a las que siguen a la inmunización principal (**Fig. 47 o, p**). Esto demuestra que ChAdOx1 nCoV-19 es inmunogénico en ratones envejecidos, y una dosis de refuerzo puede corregir el defecto dependiente de la edad en la formación de células T productoras de granzima B, $CXCR3^+$ y TEM $CD8^+$.

Sensibilización-refuerzo mejora la respuesta de las células T $CD4^+$ a ChAdOx1 nCoV-19 en ratones envejecidos

Nueve días después de la inmunización primaria de ratones envejecidos (**Fig.48 a**), se observó un aumento en las células T $Ki67^+$ $CD4^+$ y las células Th1 que expresan CXCR3 en el ganglio linfático de drenaje de los ratones inmunizados con ChAdOx1 nCoV-19 (**Fig. 48 b, c**). Esto fue acompañado por un aumento en las Treg tipo Th1 en ratones adultos y envejecidos **(Fig. 48 d**). Asimismo, se observó una mayor frecuencia de estos tipos de células en el bazo en respuesta a la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 en ratones adultos y envejecidos (**Fig. 48 e-g**). Cabe destacar que, según estas mediciones, la respuesta en ratones de edad avanzada es comparable a la de los adultos más jóvenes. La respuesta de las células T $CD4^+$ específicas de antígeno se evaluó reestimulando los esplenocitos con grupos de péptidos de proteína de pico del SARS-CoV-2. Como en los ratones jóvenes, la respuesta en los ratones de edad avanzada a ChAdOx1 nCoV-19 estuvo dominada por Th1, sin embargo, hubo menos células productoras de citocinas en los ratones de edad nueve días después de una única inmunización (**Fig 48 h, i**).

Una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 administrada un mes después de la sensibilización (**Fig.48 j**) estimuló la expresión de Ki67 y la formación de células $CXCR3^+$ $CD44^+$

Th1, pero no células Treg tipo CXCR3$^+$ Th1 en el ganglio linfático de drenaje de ratones envejecidos (**Fig. 48 k-m**). En el bazo, la dosis de refuerzo no mejoró las células T CD4$^+$ Ki67$^+$, ni la formación de células T reguladoras o convencionales CXCR3$^+$ en ratones adultos o envejecidos (**Fig. 48 n-p**). En contraste con la respuesta a la inmunización primaria, el número de células productoras de citocinas específicas de antígeno fue comparable en ratones adultos y envejecidos después de la inmunización de refuerzo (**Fig. 48 q, r**). En conjunto, esto indica que la respuesta de las células T CD4$^+$ a la inmunización con ChAdOx1 nCoV-19 está en gran parte intacta en ratones envejecidos, con una ligera deficiencia en la producción de citocinas específicas de antígeno que se puede potenciar mediante una inmunización de refuerzo.

Los ratones envejecidos tienen una respuesta del centro germinal deteriorada después de la inmunización primaria

Se cree que la mayoría de las vacunas disponibles clínicamente en la actualidad brindan protección al provocar inmunidad humoral, por tanto es importante cuantificar la respuesta de las células B con respecto a la vacunación ChAdOx1 nCoV-19 en el contexto del envejecimiento. La producción temprana de anticuerpos después de la vacunación surge de las células secretoras de anticuerpos generadas en la respuesta de las células plasmáticas extrafoliculares, que es rápida, pero típicamente de corta duración. Se detectó una respuesta de células plasmáticas temprana comparable en el aLN de ratones adultos más jóvenes y de edad avanzada después de la inmunización (**Fig.49 a, b**), aunque hubo un aumento en la proporción de células plasmáticas IgM$^+$ sin cambio de clase

en ratones envejecidos (**Fig. 49 c**). Una respuesta de células plasmáticas intactas se combinó con un aumento de los anticuerpos séricos nueve días después de la inmunización, que tenían un título solo ligeramente más bajo en ratones envejecidos y una distribución de subclases de IgG similar a la de los animales más jóvenes, nuevamente una respuesta dominada predominantemente Th1 (**Fig. 49 d-f**). Normalmente, las células secretoras de anticuerpos de larga vida surgen de la respuesta del centro germinal. El porcentaje, pero no el número total, de células B del centro germinal se redujo en ratones de edad avanzada en comparación con ratones adultos más jóvenes después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 (**Fig. 49 g, h**). Al igual que la respuesta de las células plasmáticas, hubo más células B del centro germinal IgM^+ no conmutadas en ratones envejecidos (**Fig. 49 i**). Un aumento en las células auxiliares foliculares T, pero no en las células reguladoras foliculares T, acompañó a la respuesta del centro germinal de los ganglios linfáticos en ratones adultos y envejecidos (**Fig. 49 j, k**). En el bazo, los centros germinales se visualizaron fácilmente por microscopía en ratones adultos nueve días después de la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19, pero estuvieron notablemente ausentes en ratones de edad avanzada (**Fig. 49 l**). La cuantificación de los centros germinales esplénicos mediante citometría de flujo confirmó la alteración de la formación del centro germinal en ratones envejecidos (**Fig. 49 n, o**). Esto se acompañó de una menor proliferación de células B del centro no germinal y células auxiliares foliculares T en ratones envejecidos (**Fig. 49 p, q**). Como en el ganglio linfático de drenaje, las células reguladoras

foliculares T esplénicas no fueron inducidas por la vacunación con ChAdOx1 nCoV-19 en este momento (**Fig. 49 r**). El impacto de una respuesta del centro germinal deteriorada sobre los anticuerpos específicos de la vacuna se observó 28 días después de la inmunización, y los ratones envejecidos tenían títulos más bajos de IgM e IgG anti-pico (**Fig. 49 s, t**), pero un perfil similar de subclases de IgG (**Fig. 49 u**). Juntos, estos datos indican que mientras que una sola dosis de ChAdOx1 nCoV-19 puede inducir respuestas de células plasmáticas extrafoliculares comparables entre ratones jóvenes y envejecidos, la respuesta del centro germinal se ve comprometida con la edad.

Una segunda dosis de ChAdOx1 nCoV-19 estimula la inmunidad humoral en ratones envejecidos

Para someter a prueba si una estrategia de sensibilización-refuerzo puede mejorar la respuesta de las células B en ratones envejecidos, se adoptó un enfoque de sensibilización-refuerzo (**Fig. 50a**). Nueve días después de la estimulación, había células B entrantes no germinales Ki67$^+$, células plasmáticas y células B del centro germinal en los ganglios linfáticos de drenaje de ratones envejecidos (**Fig. 50b-h**). En particular, la magnitud de la respuesta del centro germinal fue mayor en ratones de edad avanzada que en ratones adultos más jóvenes después del refuerzo (**Fig. 50f-h**) y esto se asoció con un aumento en el número de células reguladoras foliculares T auxiliares y T foliculares (**Fig. 50 i, j**). No se observó una respuesta del centro germinal en el bazo de ratones adultos o de edad nueve días después de la inmunización de refuerzo (**Fig. 50 k**). Esto demuestra que una segunda dosis de ChAdOx1 nCoV-19 puede mejorar la respuesta de las células B en ratones

envejecidos. Esta mejora en la respuesta de las células B correspondió a un aumento en los anticuerpos IgG anti-pico, pero no IgM, en cada ratón envejecido que recibió una inmunización de refuerzo, sin sesgar los isotipos de IgG. La razón después del refuerzo de IgG_2: IgG_1 era 2:1 en tanto en ratones adultos jóvenes como en ratones envejecidos (**Fig. 50 l-o**). Se midió el efecto funcional de la inmunidad humoral después de las inmunizaciones tanto de sensibilización como de refuerzo mediante un ensayo de microneutralización del virus pseudotipado del SARS-CoV-2. Nueve días después de la primera inmunización, los anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 estaban en niveles más bajos en ratones de edad avanzada que los medidos en ratones adultos (**Fig 50 p**). Nueve días después de la estimulación, se detectaron anticuerpos neutralizantes en todos los ratones de edad y se habían multiplicado por ocho en comparación con los primeros días después de la estimulación, aunque el título fue significativamente más bajo que en ratones adultos más jóvenes (**Fig 50 q**). Esto demuestra que una dosis de refuerzo de ChAdOx1 nCoV-19 puede mejorar la inmunidad humoral inducida por la vacuna en ratones más viejos.

Alojamiento y cría de ratones

Se criaron, envejecieron y mantuvieron ratones C57BL/6Babr en la Unidad de Apoyo Biológico del Instituto Babraham (BSU). No se detectaron patógenos primarios ni agentes adicionales enumerados en las recomendaciones de FELASA62 durante las encuestas de monitoreo de salud de las salas de almacenamiento de disoluciones madre. La temperatura ambiente fue de ~ 19-21°C y la humedad relativa del 52%. Se proporcionó la iluminación con una luz de 12 h: Ciclo de

oscuridad de 12 horas que incluye períodos de 15 minutos de 'amanecer' y 'anochecer' de iluminación tenue. Después del destete, se transfirieron los ratones a jaulas ventiladas individualmente con 1 a 5 ratones por jaula. Se alimentaron los ratones con la dieta CRM (P) VP (Servicios de Dieta Especial) a voluntad y recibieron semillas (por ejemplo, girasol, mijo) en el momento de la limpieza de la jaula como parte de su enriquecimiento ambiental. Toda la experimentación con ratones fue aprobada por el organismo de revisión ética y bienestar animal del Instituto Babraham. La cría de animales y la experimentación cumplieron con la legislación vigente del Ministerio del Interior del Reino Unido y la Unión Europea y las normas locales (PPL: P4D4AF812). Los ratones jóvenes tenían entre 10-12 semanas de edad y los ratones de edad entre 93-96 semanas de edad cuando se iniciaron los experimentos. Se excluyeron los ratones que tenían tumores, que pueden ocurrir en ratones viejos del análisis.

Inmunización y muestreo de tejidos

Se inmunizaron los ratones en el músculo cuádriceps femoral derecho con 50 µL de $6x10^9$ viriones de ChAdOx1 nCoV-19 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) PBS solo, o microesferas modificadas con carboxilato fluorescentes de color amarillo verdoso de 0.02 µm (Invitrogen n.º F8787) en solución salina tamponada con fosfato. En los puntos de tiempo indicados después de la vacunación, se tomaron para análisis sangre, el ganglio linfático aórtico derecho, el bazo y el músculo cuádriceps femoral derecho.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Se realizó un ELISA estandarizado para detectar anticuerpos específicos de la proteína del SARS-CoV-2 FL-S en suero. Se

recubrieron las placas MaxiSorp (Nunc) con 100 o 250 ng/pocillo de proteína FL-S durante la noche a 4°C para la detección de IgG o IgM e IgA, respectivamente, antes de lavarlas en PBS/Tween (0.05% v/v) y bloquearlas con Caseína Blocker en PBS (Thermo Fisher Scientific) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Se incubaron suero positivo estándar (conjunto de suero de ratón con título de punto final alto contra la proteína FL-S), muestras de suero de ratón individuales, negativo y un control interno (diluido en caseína) durante 2 h a TA para la detección de IgG específico o 1 h a 37°C durante la detección de IgA o IgM específico. Después del lavado, se detectaron los anticuerpos unidos mediante la adición de IgG anti-ratón de cabra conjugado con AP (Sigma-Aldrich) durante 1 h a TA o mediante la adición de IgM o IgA anti-ratón de cabra conjugado con AP (Abcam y Sigma-Aldrich, respectivamente) y adición de sustrato pNPP (Sigma-Aldrich). Se asignó un número arbitrario de unidades ELISA al grupo de referencia y los valores de DO de cada dilución se ajustaron a una curva logística de 4 parámetros usando el software SOFTmax PRO. Se calcularon las unidades de ELISA para cada muestra usando los valores de DO de la muestra y los parámetros de la curva estándar.

Se realizó el ELISA de subclase de IgG según el protocolo descrito para la detección de IgM o IgA específicas en el suero. Además, se diluyeron todas las muestras de suero a 1 unidad de ELISA de IgG total y luego se detectaron anticuerpos secundarios específicos de subclase de IgG anti-ratón (Southern Biotech o Abcam). Se presentan los resultados de la subclase ELISA de IgG usando valores de DO

en lugar de las unidades ELISA usadas para el ELISA de IgG total.

Prueba de micro neutralización usando pseudotipos basados en lentivirales que portan el pico del SARS-CoV-2.

Se generaron virus pseudotipados de SARS-CoV-2 basados en lentivirales en células HEK293T incubadas a 37 ° C, 5% de CO2 como se describió anteriormente (Graham, S.P. *et al.* Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *npj Vaccines* **5** (2020)). En resumen, se sembraron las células a una densidad de 7.5 x 10^5 en placas de 6 pocillos, antes de transfectarlas con plásmidos de la siguiente manera: 500 ng de pico de SARS-CoV-2, 600 ng de p8.91 (que codifica el VIH-1 gag-pol), 600 ng de CSFLW (columna vertebral del lentivirus que expresa un gen indicador de luciferasa de luciérnaga), en Opti-MEM (Gibco) junto con 10 µL de reactivo de transfección PEI (1 µg/mL). También se estableció un control 'sin glicoproteína' usando el vector pcDNA3.1 en lugar del plásmido que expresa el SARS-CoV-2 S. Al día siguiente, se reemplazó la mezcla de transfección con 3 ml de DMEM con FBS al 10% (DMEM-10%) y se incubó durante 48 y 72 horas después de esto, se recolectaron los sobrenadantes que contenían SARS-CoV-2 pseudotipado (SARS-CoV-2 pps), se combinaron y se centrifugaron a 1,300x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se sembraron células HEK293T diana, previamente transfectadas con 500 ng de un plásmido de expresión de ACE2 humano (Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.) A una densidad de 2 × 10^4 en 100 µL de DMEM al 10% en una placa blanca de 96 pocillos de fondo plano un día antes de la recolección de SARS-CoV-2 pps. Al

día siguiente, se titularon las pps de SARS-CoV-2 10 veces en las células diana y se almacenó el resto a -80°C. Para las pruebas de micro neutralización, se diluyeron los sueros de ratón 1:20 en medio sin suero y se añadieron 50 µl a una placa de 96 pocillos por triplicado y se tituló 2 veces. Se añadió un volumen fijo titulado de SARS-CoV-2 pps a una dilución equivalente a 10^5 unidades de luciferasa señal en 50 µL de DMEM al 10% y sueros incubados durante 1 hora a 37°C, CO_2 al 5% (proporcionando una dilución de suero final de 1:40). Luego se añadieron células diana que expresan ACE2 humano a una densidad de 2 *x* 10^4 en 100 µL y se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% durante 72 horas. Luego se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga con reactivo de luciferasa BrightGlo y un sistema de detección Glomax-Multi+ (Promega, Southampton, RU). Se expresaron los títulos de neutralización de pseudovirus como el recíproco de la dilución de suero que inhibió la expresión de luciferasa en el 50% (CI_{50}).

Estadísticas

Se realizaron todos los experimentos o bien dos veces o bien tres veces con 3–8 ratones por grupo. En primer lugar, se sometieron a prueba los datos primero para determinar la distribución gaussiana usando una prueba de Shapiro-Wilk. Luego, los datos que eran consistentes con una distribución normal se analizaron con una prueba de la t de Student para comparar dos conjuntos de datos o con una prueba ANOVA de una vía para datos con múltiples grupos. Si los datos no siguieron una distribución normal, se usó una prueba de Mann-Whitney para comparar dos conjuntos de datos y una prueba de Kruskal Wallis para comparaciones múltiples. Se ajustan todos los valores p mostrados para múltiples

comparaciones donde se realizaron múltiples pruebas con los mismos datos. Se realizaron los análisis dentro del software Prism v8 (GraphPad).

Resumen del Ejemplo 20: El trabajo presentado aquí demuestra que una dosis de vector como ChAdOx1 nCoV-19 es inmunogénico en ratones de edad avanzada, pero esta respuesta puede mejorarse significativamente con una segunda dosis (de refuerzo). Dado que una segunda dosis de ChAdOx1 nCoV-19 es inmunogénica con un perfil de reactogenicidad esperado en humanos, esta puede ser una estrategia viable para mejorar la inmunogenicidad y posiblemente la eficacia en personas mayores.

Ejemplo 21 – Efecto sobre el Desprendimiento del Virus

Los hurones son susceptibles de la infección por SARS-CoV-2. Después de la exposición intranasal de hurones al SARSCoV-2, los animales se infectan y desprenden el virus, detectado por PCR en tiempo real, durante al menos 9 días. El modelo de hurón se considera un modelo de infección para infecciones humanas asintomáticas o leves y un método eficaz para determinar la eficacia de los candidatos a vacuna mediante la evaluación de las reducciones en la diseminación del virus después de la exposición al virus. Este estudio, realizado por CSIRO, evaluó la eficacia de un vector viral de la invención (ChAdOx1 nCoV-19) contra el SARS-CoV-2 en un modelo de desafío con hurón. Se evaluó la composición de ChAdOx1 nCoV-19 mediante dos vías de administración diferentes (intranasal e intramuscular) con hurones que recibieron una o dos dosis de la composición. La cantidad de dosis fue una dosis de 2.5×10^{10} partículas virales por hurón en 100 µL de PBS.

Sistema de prueba

Se usaron hurones consanguíneos, previamente vacunados contra el virus del moquillo canino (vacuna canina Protech C3; 2 dosis), ya que son susceptibles de la infección por SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 - BetaCoV/Australia/VIC01/2020; Lot No. 2002-03-1628 se usó como inóculo de desafío en este estudio. Se realizó el crecimiento y caracterización de este inóculo de la exposición por CSIRO.

Diseño del estudio

Este fue un estudio aleatorio controlado con placebo que evaluó la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 frente a un control (PBS, placebo). La vacuna se evaluó mediante dos vías de administración diferentes, intranasal (IN) e intramuscular (IM). Se llevó a cabo el estudio como un diseño de bloques con dos cohortes de 20 animales (total de 40 animales, 20 machos y 20 hembras). El régimen de dosificación se describe en la siguiente tabla:

Cohorte de estudio	**Estudio Grupo**	**N.° de Hurones (Sexo M/F)**	**Artículos de estudio**	**Día 0**	**Día 28**	**Exposición al Virus[1]**	**Estudio Final[2]**
1	1	8 (4M & 4F)	Administración IM de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19	Sí	No	Día 28 SARS-CoV-2 3×10^4 TCID50 en 0.5 ml volumen	Día 42
	2	8 (4M & 4F)	Administración IN de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19	Sí	No		
	4	4 (2M & 2F)	Artículo de referencia 1.0 mL de PBS	Sí	No		
2	5	8 (4M & 4F)	Administración IM de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19	Sí	Sí	Día 56 SARS-CoV-2	Día 70

	6	8 (4M & 4F)	Administración IN de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19	Sí	Sí	3×10^4 TCID50 en 0.5 ml volumen	
	8	4 (2M & 2F)	Artículo de referencia 1.0 mL de PBS	Sí	Sí		

Notas:

[1] Dosis de exposición objetiva basada en el título caracterizado de la disolución madre del virus de la exposición

En la exposición (cohorte 1 - día 28; cohorte 2 - día 56), se expusieron todos los hurones por vía intranasal a un objetivo de 3×10^4 dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50% (TCID50) de SARS-CoV-2.

Después de la exposición, se observó en los hurones el inicio y la progresión de la enfermedad, con todos los hurones muestreados en la cohorte 1 los días 31, 33, 35, 37 y 39 y en la cohorte 2 los días 59, 61, 63, 65 y 67. El día 42 (cohorte 1) o el día 70 (cohorte 2), se recolectaron muestras de sangre de los hurones y luego, entre los días 43-45 (cohorte 1) o los días 71-73 (cohorte 2), se sacrificaron los hurones de manera humanitaria y se recolectaron una variedad de muestras en la necropsia para su análisis.

Determinación de la Carga de ARN Viral en Muestras

Se determinó la carga de ARN viral para todas las muestras de tejido, hisopos y muestras de lavado nasal después de la extracción y el análisis de ARN mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), con pruebas para la detección de ARN del SARS-CoV-2 realizadas en reacciones duplicada. Las secuencias de

cebador y sonda para ensayos de qRT-PCR de coronavirus se encuentran en la tabla a continuación:

Nombre de la	**Secuencia**
CoV E fwd (SEQ ID	5′- AGTACGAACTTATGTACTCATTCGTT -3′
CoV E rev (SEQ ID	5′- ATATTGCAGCAGTACGCACACA -3′
CoV sonda (SEQ ID	5′- 6FAM ACA CTA GCC ATC CTT CG

Se calcularon los números de copias para muestras individuales usando valores de umbral de ciclo (CT) como copias del gen de SARS-CoV-2 E por ml o por g, con una ecuación establecida a partir de los datos de la curva estándar utilizando un estándar de ADN sintético de concentración conocida del número de copias.

Determinación de la Carga Viral Infecciosa en Muestras

Se analizaron adicionalmente las muestras que dieron positivo por qRT-PCR con un valor de CT de menos de 35 por TCID50.

Prueba de qRT-PCR de muestras de hisopo y lavado nasal

Todas las muestras de lavado nasal e hisopo recolectadas en el acontecimiento de muestreo previo a la provocación (Día 24 - Cohorte 1; Día 52 -
Cohorte 2)tenían niveles indetectables de ARN de CoV E, según lo sometido a prueba por qRT-PCR (QA / 23-2-43).

Números de copias de ARN
(Log10 CoV E copias/mL) para cada muestra recolectada después de la exposición se muestran en la Figura 8 a la Figura 11 para
Días 3, 5, 7, 9 posteriores al desafío (Días 31, 33, 35 y 37 - Cohorte 1; Días 59, 62, 63 y 65 - Cohorte 2).

No se detectó diseminación de virus los días 11 o 14 de ningún hurón (Días 39 y 42 – Cohorte 1; Días 67 y 70 – Cohorte 2).

Se realizó un análisis estadístico para cada uno de los Grupos de Estudio frente a los controles agrupados (Grupos de Estudio 4 y 8). Se enumeran los valores de p para las pruebas de la t no apareadas en la Tabla a continuación: Importancia estadística de las cargas de ARN viral en los grupos de estudio en comparación con los controles agrupados:

Lavado nasal				
Día tras la exposición	Grupo del Estudio			
	Grupo 1 – IM solo	Grupo 5 – IM sensibilizaci	Grupo 2 – IN solo	Grupo 6 – IN sensibilizaci
Día 3	0.5368	0.2898	0.3165	**0.0292**
Día 5	0.1034	**0.0247**	0.3199	**0.0036**
Día 7	**0.0282**	**0.0156**	**0.0149**	**0.0097**
Día 9	0.1379	0.1676	0.1379	0.1379
Hisopo oral				
Día tras la exposición	Grupo del Estudio			
	Grupo 1 – IM solo	Grupo 5 – IM sensibilizaci	Grupo 2 – IN solo	Grupo 6 – IN sensibilizaci
Día 3	**0.0275**	0.1072	**0.0438**	**0.0116**
Día 5	**0.0189**	**0.0118**	0.2230	**0.0071**
Día 7	0.2643	0.2997	0.2643	0.2643
Día 9	0.2643	0.2997	0.2643	0.2643

Notas: Los valores de p en negrita tienen significación estadística en una prueba de la t no apareada ($p < 0.05$).
Como no se detectó ARN viral los días 11 y 14 después de la exposición, no se pudo realizar ningún análisis estadístico.

La Figura 51 muestra gráficos de barras de la carga viral en el lavado nasal y los fluidos de los hisopos rectales y

orales medidos por qRT-PCR el día 3 después de la exposición (día del estudio 31 - cohorte 1 o 59 - cohorte 2).

La Figura 52 muestra gráficos de barras de la carga viral en el lavado nasal y los fluidos de los hisopos rectales y orales medidos por qRT-PCR el día 5 después de la exposición (día del estudio 33 - cohorte 1 o 61 - cohorte 2) analizada.

La Figura 53 muestra gráficos de barras de la carga viral en el lavado nasal y los fluidos de los hisopos rectales y orales medidos por qRT-PCR el día 7 después de la exposición (día del estudio 35 - cohorte 1 o 63 - cohorte 2).

La Figura 54 muestra gráficos de barras de la carga viral en el lavado nasal y los fluidos de los hisopos rectales y orales medidos por qRT-PCR el día 9 después de la exposición (día del estudio 37 - cohorte 1 o 65 - cohorte 2).

Notas para las figuras 51 54: El ARN se extrajo de las muestras analizadas por duplicado usando un ensayo de qRT-PCR que detecta ARN de CoV E. Los puntos negros representan el título medio de las reacciones duplicadas para hurones individuales, las barras son los títulos medios para cada grupo, las barras de error representan el error estándar de la media y las líneas punteadas son el límite de detección del ensayo. Cuando no se detectó ARN viral mediante qRT-PCR, se trazó un punto de datos en 3.9.

Resumen del Ejemplo 21: Este ejemplo muestra una disminución en la diseminación de virus promedio, detectada por qRT-PCR de muestras de lavado nasal, hisopado oral e hisopado rectal, en todos los grupos de estudio de hurones

a los que se les administró la composición de la invención (vacuna) en comparación con los controles en los puntos de tiempo evaluados tras la exposición. Estas reducciones fueron estadísticamente significativas en los títulos de lavado nasal e hisopo en diversos momentos. Un régimen de sensibilización/refuerzo logró mejores reducciones en la eliminación en comparación con una sola administración.

Ejemplo 22: Seguridad y eficacia de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) frente al SARS-CoV-2

Métodos. Se han descrito ensayos de eficacia de fase III de ChAdOx1 nCoV-19 en el Reino Unido y Brasil, y ensayos clínicos de fase I/II en el Reino Unido y Sudáfrica que incluyen una cohorte de eficacia. Todos los estudios contribuyen aquí a un análisis de seguridad combinado. Las cohortes de eficacia de fase III en el RU y Brasil contribuyen a las evaluaciones de eficacia. En las cohortes de eficacia, se asignan al azar los participantes mayores de 18 años 1:1 para recibir dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 o un control/placebo (una vacuna meningocócica conjugada, MenACWY, en el RU; solución salina en Sudáfrica; y, en Brasil, MenACWY para la primera dosis y solución salina para la segunda). Los participantes del grupo ChAdOx1 nCoV-19 recibieron dosis que contenían ~ $5x10^{10}$ partículas virales (dosis estándar: SD), excepto un subgrupo que recibió media dosis como primera dosis en el RU (dosis baja: LD). El criterio de valoración principal es la enfermedad sintomática COVID-19, definida como una muestra positiva de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) con al menos uno de los siguientes síntomas: fiebre ≥ 37.8°C; tos; dificultad para respirar; anosmia o ageusia. Se evaluó cada caso positivo de NAAT por un comité de

revisión de criterios de valoración independiente y ciego que también clasificó la gravedad de cada caso de acuerdo con la escala de progresión clínica de la OMS. El análisis primario incluyó solo a participantes que eran seronegativos al inicio del estudio y tenían enfermedad COVID-19 positiva para NAAT sintomática> 14 días después de la segunda dosis de vacuna. Un análisis secundario incluyó casos que ocurrieron más de 21 días después de la primera vacuna de dosis estándar en aquellos que recibieron una o dos dosis estándar. Para medir la eficacia contra la enfermedad asintomática, se identificaron casos asintomáticos mediante el uso de hisopo semanal de rutina en el RU

Se calculó la eficacia de la vacuna como 1 - riesgo relativo derivado de un modelo de regresión de Poisson robusto ajustado por edad en el momento de la aleatorización. Se usó alfa del 4.16% para el análisis intermedio.

Se recopilaron acontecimientos adversos graves durante el período de estudio.

Los estudios están en curso, y se registran en ISRCTN89951424 y ClinicalTrials.gov, NCT04324606, NCT04400838, NCT04444674.

Hallazgos: Desde el inicio de los ensayos de fase I en el RU el 23 de abril de 2020, un total de 24,103 participantes se han inscrito en ensayos clínicos de ChAdOx1 nCoV-19 en los tres países, 11829 en el RU, 2096 en Sudáfrica y 10178 en Brasil. De estos, 11636 fueron elegibles para su inclusión en el análisis primario de eficacia > 14 días después de la segunda dosis de vacuna (7548 en el RU, 4088 en Brasil). Hubo 30 casos sintomáticos

de COVID-19 en el grupo vacunado con ChAdOx1 nCoV-19 y 101 casos en el grupo de control. La eficacia de la vacuna más de 14 días después de la segunda dosis fue del 70.4% (IC del 95.8%: 54.8%, 80.6%). La eficacia de la vacuna para los que recibieron LD/SD fue del 90.0% (IC del 95% 67.4%, 97.0%) en comparación con el 60.3% (28.0%, 78.2%) en los que recibieron SD/SD.

A partir de 21 días después de la primera dosis hubo 10 casos hospitalizados por COVID-19, y dos se clasificaron como graves. Los 10 estaban en el brazo de control del estudio. La eficacia de la vacuna para estos criterios de valoración no se calculó debido a su número pequeño. Hubo una muerte por COVID-19, en el brazo de control del estudio.

La eficacia frente a una infección asintomática en el RU fue del 27.3% (IC del 95% -17%, 55%) para la cohorte del análisis primario, y fue del 58.9% (IC del 95%, 1.0%, 82.9%) entre los que recibieron LD/SD y el 3.8 % (-72.4%, 46.3%) en los que recibieron SD/SD.

En una cohorte de seguridad que incluyó 73480 meses-persona de seguimiento, se informaron 144 acontecimientos adversos graves (AAG) que se consideraron no relacionados con ninguna de las intervenciones del estudio. Se evaluó una AAG como posiblemente relacionada con la vacuna en el grupo de vacuna ChAdOx1 nCoV-19 y una en el grupo de control. También se notificó un caso de fiebre intensa relacionado con la vacuna.

Interpretación: ChAdOx1 nCoV-19 tiene un perfil de seguridad aceptable y es eficaz contra la enfermedad COVID-19 sintomática en este análisis intermedio de un ensayo clínico en curso

Detalle:

Tras el inicio de un ensayo clínico de fase I en el RU (COV001) el 23 de abril de 2020, se iniciaron otros tres ensayos controlados aleatorios de la vacuna candidata en el RU (COV002), Brasil (COV003) y Sudáfrica (COV005). El estudio de fase I (COV001) incluyó una cohorte de eficacia y los estudios de fase II y III (COV002, COV003 y COV005) ampliaron la inscripción a una población más amplia de participantes con mayor probabilidad de exposición al virus, tal como los trabajadores de la salud. Se redujeron los criterios de exclusión para la fase III y también se inscribieron adultos mayores con una variedad de comorbilidades. Básicamente, todos los estudios han completado la inscripción de sus respectivas cohortes de eficacia y se encuentran en la fase de seguimiento, con la excepción de un pequeño número de voluntarios que aún se están reclutando en una cohorte VIH positiva en el RU y adultos mayores en Brasil. Aquí presentamos el análisis intermedio combinado de la eficacia de la vacuna contra la infección sintomática por COVID-19 de estos cuatro ensayos controlados aleatorios de ChAdOx1 nCoV-19.

Métodos

La seguridad y eficacia de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 se está evaluando mediante un análisis conjunto global que incorpora datos de cuatro estudios clínicos de fase I, II y III en curso de la vacuna. El análisis agrupado de los datos de estos estudios proporciona una mayor precisión para los resultados de eficacia y seguridad que se puede lograr en estudios individuales y proporciona una comprensión más amplia del uso de la vacuna en diferentes poblaciones. Se desarrolló un plan de análisis estadístico

para el análisis global agrupado de estos estudios antes del bloqueo y análisis de datos.

COV001 (RU)

En este gran ensayo clínico de fase I/II en curso en 5 sitios en el RU, se han inscrito 1077 voluntarios sanos de entre 18-55 años tal como se describió anteriormente. En resumen, se inscribieron participantes adultos sanos después de la evaluación para excluir a aquellos con estados de salud preexistentes. Se asignaron al azar los participantes en las cohortes de eficacia 1:1 para recibir 2 dosis de ChAdOx1 nCoV-19 a una dosis de 5×10^{10} partículas virales (vp), o MenACWY como control. Se planeó este estudio originalmente como un estudio de dosis única, pero el protocolo se modificó a un régimen de 2 dosis para las cohortes de eficacia como resultado de respuestas de refuerzo sólidas identificadas en la evaluación de las cohortes de inmunogenicidad temprana.

COV002 (RU)

En este estudio de fase II/III simple ciego en curso en el RU, 19 sitios de estudio en Inglaterra, Gales y Escocia inscribieron a participantes, particularmente dirigidos a aquellos que trabajan en profesiones con alta posible exposición al SARS-CoV-2, tal como los entornos de atención sanitaria y social. Se inscribieron los participantes en cohortes de eficacia (grupos 4, 6, 9, 10) en tres grupos de edad, 18-55 años, 56-69 años y 70 años o más, sin límite de edad superior. Se han incluido personas con estados de salud preexistentes estables y el objetivo era inscribir aproximadamente al 20% de los participantes en los dos grupos de mayor edad. Se han descrito anteriormente los participantes inscritos en subgrupos de inmunogenicidad y/o

se han publicado anteriormente y no se incluyen más en este ejemplo. En el ensayo del RU se incluyeron dos niveles de dosis: en el grupo LD/SD, los participantes recibieron media dosis de la vacuna (~ 2.5 x 10^{10} vp) como primera dosis (LD) y se reforzaron con una dosis estándar (SD); Se vacunaron las cohortes posteriores con dos vacunas de dosis estándar (SD/SD). Se basó la selección de la dosis inicial en la misma medición de espectrofotometría usada en el estudio de fase I (COV001), pero, como resultado de una diferencia en el proceso de fabricación, se demostró posteriormente que subestimaba la dosis, dado como resultado una dosis media (LD), y se ajustó la dosis usando qPCR a SD, dando como resultado la inscripción de 2 grupos de vacuna con diferentes regímenes de dosificación. Los detalles completos están disponibles en el protocolo.

COV003 (Brasil)

En este estudio de fase III simple ciego en curso en Brasil, el enfoque del reclutamiento se centró en aquellos con alto riesgo de exposición al virus, incluidos los trabajadores de la salud en 6 sitios en todo Brasil. Este ensayo incluyó a personas con estados de salud preexistentes estables. A todos los participantes se les ofrecieron dos dosis de la vacuna a una dosis de ~5 x 10^{10} vp administradas con 4 semanas de diferencia. Los participantes fueron reclutados en todos los grupos de edad mayores de 18 años con aproximadamente el 20% mayor de 55 años de edad. Los detalles completos están disponibles en el protocolo del estudio.

COV005 (Sudáfrica)

Este estudio en curso en Sudáfrica es un estudio de fase I/II doble ciego en adultos sanos de entre 18-65 años que

viven sin el VIH. También se inscribió una cohorte adicional de inmunogenicidad de personas que viven con el VIH, pero no se incluyen en este informe. A todos los participantes se les ofrecieron dos dosis de la vacuna a una dosis de ~5 x 10^{10} vp, con dosis administradas con 4 semanas de diferencia (mediana y rango). Un pequeño subgrupo de 44 participantes recibió una vacuna de dosis baja. Los detalles completos están disponibles en el protocolo del estudio.

Aleatorización

En las cohortes de eficacia de todos los estudios, se asignaron al azar los participantes 1:1 para recibir ChAdOx1 nCoV-19 o un producto de control. El estadístico del estudio preparó las listas de aleatorización y las subió a la plataforma web segura usada para el estudio eCRF (REDCap 9.5.22 - © 2020 Vanderbilt University) para COV001, COV002 y COV003. En Sudáfrica, la lista de asignación al azar estuvo a cargo del farmacéutico del estudio no cegado que preparó las vacunas para la administración. Se cubrieron las jeringas de la vacuna con un material opaco para evitar que los participantes del estudio lo vieran.

Vacunas administradas

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 es un vector adenoviral de simio de replicación deficiente que expresa la proteína de pico (S) del SARS-CoV-2 de longitud completa. En COV002, se eligió la vacuna conjugada antimeningocócica de los grupos A, C, W e Y (MenACWY) como la vacuna del grupo de control para minimizar la posibilidad de que el participante dejara de cegar accidentalmente debido a reacciones locales o sistémicas a la vacuna. COV003 usó MenACWY como control para la primera dosis y solución salina para la segunda

dosis. En COV005, a los participantes asignados al azar al grupo de control se les administró solución salina.

En COV001, COV002 y COV003 se diseñaron inicialmente para evaluar una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 en comparación con el control. Sin embargo, después de revisar los datos de respuesta de anticuerpos del estudio de fase 1/2 (COV001) y en la cohorte de inmunogenicidad en adultos mayores en fase II que mostró un aumento en los títulos de anticuerpos totales y neutralizantes después de una dosis de refuerzo, se incorporó una dosis de refuerzo en todos los ensayos.

Verificación del criterio de valoración

Enfermedad COVID-19 sintomática

Se pidió a los participantes que se pusieran en contacto con el sitio del estudio si experimentaban síntomas específicos asociados con COVID-19 y recibían recordatorios regulares para hacerlo. Aquellos que cumplieron con los criterios sintomáticos se sometieron a una evaluación clínica, se les tomó un hisopo para NAAT y se tomaron muestras de sangre por seguridad e inmunogenicidad. En el RU y Brasil, la lista de síntomas que calificaban para el hisopo incluía cualquiera de los siguientes: fiebre ≥ 37.8°C; tos; dificultad para respirar; anosmia o ageusia. En Sudáfrica, la lista de síntomas calificativos para el hisopo era más amplia e incluía mialgia, escalofríos, dolor de garganta, dolor de cabeza, congestión nasal, diarrea, secreción nasal, fatiga, náuseas, vómitos y pérdida del apetito.

En todos los estudios, si los participantes fueron evaluados fuera del ensayo, ya sea en su lugar de trabajo si es un trabajador de la salud, o por proveedores

privados, se registraron estos resultados y se evaluaron por un comité de revisión de criterios de valoración independiente. Se registró la fuente de cada hisopo más los detalles del kit de prueba cuando estaban disponibles.

Infección asintomática por COVID-19

Se pidió a los participantes de COV002 en el RU que proporcionaran un hisopo de nariz/garganta autoadministrado semanalmente para las pruebas de NAAT desde una semana después de la primera vacunación usando kits proporcionados por el Departamento de Salud y Atención Social (DHSC). Los participantes tomaron hisopos en sus hogares y los enviaron a laboratorios de pruebas DHSC dedicados para su procesamiento. Se informaron a los participantes directamente de sus resultados por mensaje de texto o correo electrónico del Servicio Nacional de Salud (NHS). Los resultados de los hisopos de los participantes en inglés y galés se proporcionaron al estadístico del ensayo a diario por el NHS y se compararon con los individuos según los datos de identificación personal (nombre, fecha de nacimiento, número del NHS, código postal). Los resultados de los hisopos de los participantes del NHS escocés no estaban disponibles para el equipo de estudio en el momento de la fecha de corte de los datos para este análisis. Cualquier resultado de los hisopos que no pudieron compararse con un participante del estudio usando al menos dos datos personales no se añadieron a la base de datos del estudio.

Revisión del criterio de valoración

Se revisaron todos los casos por dos miembros de un equipo de revisión clínica independiente ciego que evaluó los detalles clínicos, incluidos el historial médico, los

síntomas, los eventos adversos y los resultados de los hisopos, y asignó puntuaciones de gravedad de acuerdo con la escala de progresión clínica de la Organización Mundial de la Salud (Marshall JC, Murthy S, Diaz J, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases* 2020).

Inclusión en el análisis

Los participantes en todos los estudios se incluyen aquí en tablas de seguridad. Sin embargo, cada estudio tenía que cumplir con los criterios preespecificados de tener al menos 5 casos elegibles para su inclusión en el resultado primario antes de que se incluyera un estudio en los análisis de eficacia. Ni COV001 ni COV005 cumplieron estos criterios y, por tanto, no se incluyen en la evaluación de eficacia para este análisis intermedio.

Métodos estadísticos

El plan para evaluar la eficacia y seguridad de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 se basa en análisis globales que utilizan todos los datos disponibles de cuatro estudios con análisis agrupados entre los estudios. Se desarrolló un plan de análisis estadístico global para agrupar los datos del estudio, después de un extenso asesoramiento de los reguladores, para especificar previamente los análisis que contribuirían a la evaluación de la eficacia, y esto se firmó antes de realizar cualquier análisis de datos.

Se calculó la eficacia de la vacuna como 1: el riesgo relativo ajustado (ChAdOx1 nCoV-19 frente a grupos de control) calculado mediante un modelo de regresión de Poisson con varianza robusta (Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *American journal of epidemiology* 2004; **159**(7): 702-

6). El modelo contenía términos para estudio, grupo de tratamiento y grupo de edad en el momento de la asignación al azar. Se usó un modelo reducido que no contenía un término para la edad para los modelos afectados por problemas de convergencia debido a que tenían pocos casos en los grupos de mayor edad. El logaritmo del período en riesgo para el criterio de valoración principal para el análisis agrupado se utilizó como una variable de compensación en el modelo para ajustar a los voluntarios que tenían diferentes tiempos de seguimiento durante los cuales ocurrieron los acontecimientos.

El plan de análisis agrupado global permitió un análisis de eficacia intermedio y final con alfa ajustado entre los dos utilizando una función de gasto de alfa gamma flexible, y se declaró la significancia si el límite inferior del intervalo de confianza del 1-α% es superior al 20% . La evidencia de eficacia en el momento del análisis intermedio no se consideró motivo para detener los ensayos y todos los ensayos continúan acumulando datos adicionales que se incluirán en análisis futuros.

Se planificó que el primer análisis intermedio se activara cuando se hubieran acumulado al menos 53 casos en participantes que recibieron dos vacunas de dosis estándar (SD/SD) que cumplían con la definición de resultado primario más de 14 días después de la segunda dosis. Este análisis proporciona una potencia del 77% para que el umbral del 20% asuma una verdadera eficacia de la vacuna del 70%. Debido al rápido aumento en la incidencia de COVID-19 en el RU en octubre, combinado con retrasos en el envío de muestras de referencia para la evaluación de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 en el momento de la

vacunación, no se pudo realizar un análisis de 53 casos. En el momento del bloqueo de los datos para este análisis intermedio, 98 casos estaban disponibles para su inclusión en las cohortes SD/SD y, según estos números, el nivel alfa calculado usando la función de gasto gamma alfa para este análisis es 4.16%.

Se excluyeron los participantes del análisis primario de eficacia si eran seropositivos al inicio del estudio o no tenían un resultado inicial. Se midieron las muestras de suero al inicio del estudio en un ensayo serológico validado usando el antígeno de la nucleocápside de SARS-COV-2 y ejecuciones en PPD Central Labs (Zaventem, Bélgica y Highland Heights, KY, EE. UU.). La prueba serológica Roche Elecsys Anti-SARS-CoV-2 es una modalidad basada en inmunoensayo de electroluminiscencia que permite la detección cualitativa de IgG reactiva a la nucleoproteína del SARS-CoV-2 en sueros humanos. Otras exclusiones incluyeron a aquellos con hisopos positivos para NAAT antes de 15 días después de la segunda vacunación, o aquellos que interrumpieron el estudio antes de haber alcanzado el criterio de valoración principal de eficacia y su tiempo de seguimiento fue inferior a 15 días después de la segunda vacunación.

Se realizó un análisis de eficacia después de una primera vacuna SD como análisis secundario. Se excluyeron los individuos si tenían un hisopo positivo para NAAT antes de 22 días después de una primera dosis administrada como SD, o si la primera dosis era LD.

Se analizaron los participantes según las vacunas que recibieron, con un análisis de sensibilidad realizado por intención de tratar.

Se realizó el análisis de datos usando R versión 3.6.1 o posterior. Se ajustaron modelos robustos de Poisson usando la función "proc genmod" en SAS versión 9.4. Se calculó el nivel alfa para el análisis usando la función "gsDesign" en R.

Resultados

Hubo 24103 participantes que fueron reclutados y vacunados (1077 RU (COV001), 10752 RU (COV002), 10178 Brasil (COV003) y 2096 Sudáfrica (COV005)). Un total de 11636 participantes en COV002 y COV003 cumplieron con los criterios de inclusión para el análisis primario, 5807 recibieron 2 dosis de ChAdOx1-nCoV-19 y 5829 recibieron dos dosis del producto de control.

De los participantes en COV002 y COV003 incluidos en los análisis primarios, la mayoría tenía entre 18 y 55 años (RU 6542, 87%; Brasil 3676, 90%). Aquellos de 56 años o más fueron reclutados más tarde y contribuyeron con el 12% de la cohorte total (RU: 1006, 13%, Brasil: 412, 10%). 7045 (61%) participantes eran mujeres. La mayoría de los participantes en el Reino Unido eran blancos 6902 (91%). En Brasil 2723 (67%) participantes eran blancos.

El momento de la administración de la vacuna de sensibilización y de refuerzo varió entre los estudios debido principalmente a retrasos en la fabricación y el envío. La mayoría 1459/2741 (53%) de los participantes en COV002 en el grupo LD/SD recibieron una segunda dosis al menos 12 semanas después de la primera (mediana 84 días, IQR 77, 91 días), muy pocos 22/2741 (0.8%) recibió una segunda dosis en 8 semanas o menos. La mediana de la diferencia de tiempo para el grupo SD/SD en COV002 fue de 69 días (IQR 50, 86 días). Por el contrario, la mayoría

2493/4088 (61%) de los participantes en COV003 en el grupo SD/SD recibieron una segunda dosis dentro de las 6 semanas de la primera (mediana 36 días, IQR, 32, 58 días). (Tabla a continuación).

Tabla: Administración de vacunas incluidas en el análisis primario

(La población de eficacia LDSD, SDSD según se define en el plan de análisis estadístico).

	COV002 (RU)		**COV003 (Brasil)**	
Estudio	**ChAdOx1 nCoV-19 N (%)**	**MenACWY N (%)**	**ChAdOx1 nCoV-19 N (%)**	**MenACWY N (%)**
Tiempo entre la primera y la segunda dosis LD/SD				
< 6 semanas	0 (0.0%)	0 (0.0%)		
6-8 semanas	10 (0.7%)	12 (0.9%)		
9-11 semanas	624 (45.6%)	636 (46.3%)		
≥12 semanas	733 (53.6%)	726 (52.8%)		
Tiempo entre la primera y la segunda dosis SD/SD				
< 6 semanas	453 (19.1%)	454 (18.7%)	1249 (60.5%)	1244 (61.4%)
6-8 semanas	517 (21.8%)	464 (19.1%)	430 (20.8%)	431 (21.3%)

9-11 semanas	595 (25.0%)	665 (27.4%)	285 (13.8%)	275 (13.6%)
≥12 semanas	812 (34.2%)	847 (34.9%)	99 (4.8%)	75 (3.7%)

Una pequeña proporción de participantes era seropositiva al inicio del estudio (RU: 144, 1.3%, Brasil, 235 2.3%). Tres participantes seropositivos al inicio del estudio tuvieron muestras posteriores positivas para NAAT. Un participante tuvo una infección asintomática 3 semanas después de una primera dosis de ChAdOx1 nCoV-19. Otros dos participantes en el grupo de control tuvieron infecciones sintomáticas 8 y 21 semanas después de que se tomó la muestra de referencia.

Hubo 131 casos de COVID-19 sintomático en receptores de LD/SD o SD/SD que fueron elegibles para su inclusión en el análisis primario más de 14 días después de la segunda dosis de vacuna. Hubo 30/5807 (0.5%) casos en el brazo de la vacuna y 101/5829 (1.7%) casos en el grupo de control, lo que dio como resultado una eficacia de la vacuna del 70.4% (IC del 95.8% 54.8%, 80.6%) (Tabla 3). En aquellos que recibieron vacunas SD/SD, hubo 27/4440 (0.6%) casos en el brazo de la vacuna y 71/4455 (1.6%) casos en el grupo de control, lo que dio como resultado una eficacia del 62.1% (IC del 95% 41.0%, 75.7%). En aquellos que recibieron una dosis baja como primera dosis de vacuna, hubo 3/1367 (0.2%) casos en el grupo de vacuna y 30/1374 (2.2%) casos en el grupo de control con una eficacia de la vacuna del 90.0% (IC del 95%). 67.4%, 97.0%) (Tabla a continuación)

Tabla: Eficacia frente a SARS-CoV-2 más de 14 días después de una segunda dosis de vacuna ChAdOx1 nCoV-19 en participantes seronegativos*

COVID-19 sintomático primario†	**Número total de casos**	**ChAdOx1 nCoV-19 n/N (%)**	**Control n/N (%)**	**EV (IC)** El 95% a menos que se indique ‡
COV002 (RU)	86	18/3744 (0.5%)	68/3804 (1.8%)	73.5% (55.5%, 84.2%)
Receptores de LD/SD	33	3/1367 (0.2%)	30/1374 (2.2%)	90.0% (67.4%, 97.0%)£
Receptores de SD/SD	53	15/2377 (0.6%)	38/2430 (1.6%)	60.3% (28.0%, 78.2%)
COV003 (Brasil)	45	12/2063 (0.6%)	33/2025 (1.6%)	64.2% (30.7%, 81.5%)£
Todos los receptores de SD/SD	**98**	**27/4440 (0.6%)**	**71/4455 (1.6%)**	**62.1% (41.0%, 75.7%)**
Todos los receptores de LD/SD y SD/SD‡	**131**	**30/5807 (0.5%)**	**101/5829 (1.7%)**	**70.4% (54.8%, 80.6%)**
Otra enfermedad COVID-19 sintomática	18	7/5807 (0.1%)	11/5829 (0.2%)	36.4% (-63.8%, 75.3%)£

Cualquier enfermedad COVID-19 sintomática	149	37/5807 (0.6%)	112/5829 (1.9%)	67.1% (52.3%, 77.3%)
Asintomático o síntomas desconocidos (COV002)	69	29/3288 (0.88%)	40/3350 (1.19%)	27.3% (-17.2%, 54.9%)
Receptores de LD/SD	24	7/1120 (0.62%)	17/1127 (1.5%)	58.9% (1.0%, 82.9%)£
Receptores de SD/SD	45	22//2168 (1.0%)	23/2223 (1.0%)	3.8% (-72.4%, 46.3%)
Cualquier NAAT+	221	68/5807 (1.2%)	153/5829 (2.6%)	55.7% (41.1%, 66.7%)

† Hisopo NAAT+ más al menos uno de: tos, dificultad para respirar, fiebre> 37.8°C, anosmia, ageusia; LD/SD: sensibilización de dosis baja, refuerzo de dosis estándar, SD/SD: dos vacunas de dosis estándar administradas; EV: eficacia de la vacuna calculada a partir del modelo robusto de Poisson. NAAT: prueba de amplificación de ácido nucleico. *La población de eficacia LDSD, SDSD según se define en el plan de análisis estadístico. ♯ IC del 95.8% usado para el análisis primario. £ EV (CI) calculado a partir de un modelo de Poisson robusto reducido que no se ajustó por edad

En Inglaterra y Gales, el DHSC procesó 129529 autoexplosiones semanales, de los cuales 126324 pudieron emparejarse con los participantes del estudio. Hubo 435

hisopos positivos, de los cuales 354 pudieron emparejarse. Los síntomas en estos participantes no se evaluaron de forma rutinaria, ya que se hicieron hisopos en casa y se enviaron para su análisis por correo. Se detectaron infecciones asintomáticas o con síntomas no informados en 69 participantes. La eficacia de la vacuna en 24 receptores de LD/SD fue del 58.9% (IC del 95%: 1.0%, 82.9%) y en 45 participantes que recibieron SD/SD la eficacia de la vacuna fue del 3.8% (IC del 95% -72.4%, 46.3%). (Tabla anterior) Se realizó un análisis secundario de los casos que ocurrieron más de 21 días después de la primera dosis estándar en aquellos que recibieron solo dosis estándar. Se incluyeron 192 casos (51/6307 (0.8%) vacuna y 141/6297 (2.2%) control) con una EV del 64.1% (IC del 95%, 50.5%, 73.9%). (Table a continuación)

Tabla: Eficacia contra el SARS-CoV-2 más de 21 días después de una o dos dosis estándar de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 en participantes seronegativos*

	Número total de casos	**ChAdOx1 nCoV-19 n/N (%)**	**Control n/N (%)**	**EV (95% CI)**
COV002 (RU)	90	28/3060 (0.9%)	62/3064 (2.0%)	55.0% (29.7%, 71.1%)
COV003 (Brasil)	102	23/3247 (0.7%)	79/3233 (2.4%)	71.2% (54.2%, 81.9%)
COVID-19 sintomático primario†	**192**	**51/6307 (0.8%)**	**141/6297 (2.2%)**	**64.1% (50.5%, 73.9%)**

Otra enfermedad COVID-19 sintomática	21	12/6307 (0.2%)	9/6297 (0.1%)	-32.8% (-214.8%, 44.0%)£
Cualquier enfermedad COVID-19 sintomática	213	63/6307 (1.0%)	150/6297 (2.4%)	58.3% (44.0%, 68.9%)
Asintomático o síntomas desconocidos (COV002)	71	34/2751 (1.2%)	37/2760 (1.3%)	7.8% (-46.7%, 42.1%)
Cualquier NAAT+	291	102/6307 (1.6%)	189/6297 (3.0%)	46.3% (31.8%, 57.8%)

† Hisopo NAAT+ más al menos uno de: tos, dificultad para respirar, fiebre> 37.8°C, anosmia, ageusia; EV: eficacia de la vacuna calculada a partir del modelo robusto de Poisson. NAAT: prueba de amplificación de ácido nucleico. *La población de eficacia 1 dosis de SD según se define en el plan de análisis estadístico. SD: vacuna de dosis estándar. £ EV (IC) calculado a partir de un modelo de Poisson robusto reducido (excluyendo la categoría de grupo de edad debido a que el modelo completo no convergió). Se excluyeron los participantes con una sensibilización de dosis baja.

Durante el período de tiempo de más de 21 días después de la primera dosis, 10 participantes fueron hospitalizados debido a COVID-19 (definido como una puntuación de progresión clínica de la OMS> = 4), de los cuales, 2 casos se evaluaron como graves (puntuación de la OMS> = 6)

incluyendo un caso fatal. Los 10 casos estaban en el grupo de control. (Tabla a continuación).

Tabla: Hospitalización y enfermedad grave

	ChAdOx1 nCoV-19	**Control**
Hospitalización (Puntuación de progresión clínica de la OMS de 4 o más)		
<= 21 días tras la primera dosis	2*	6
> 21 días tras la primera dosis, <= 14 días tras la segunda dosis	0	5
> 14 días tras la segunda dosis	0	5
COVID-19 grave (Puntuación de progresión clínica de la OMS de 6 o más)		
<= 21 días tras la primera dosis	0	0
> 21 días tras la primera dosis, <= 14 días tras la segunda dosis	0	1
> 14 días tras la segunda dosis	0	1

VE no calculado debido al pequeño número de análisis. Un caso de enfermedad grave fue fatal. Las puntuaciones de progresión clínica de la OMS fueron asignadas por un comité de adjudicación de criterios de valoración independiente y ciego * un caso el día de la vacunación y un caso diez días después de la vacunación.

Cinco casos incluidos en el análisis primario ocurrieron en los que tenían más de 55 años. No se pudo evaluar la eficacia de la vacuna en grupos de mayor edad, pero se determinará después de que se hayan acumulado más casos.

También se ha hecho referencia a la Figura 55, que muestra la incidencia acumulada de Kaplan Meier de la enfermedad NAAT+ COVID-19 sintomática después de 1 o más dosis estándar (izquierda) o después de 2 dosis (derecha). El área sombreada en gris muestra el período de exclusión después de cada dosis en el que los casos se excluyeron del análisis. Las líneas punteadas muestran una región de confianza del 95%.

Discusión del Ejemplo 22

Ningún ensayo previo ha informado de la eficacia de una vacuna de coronavirus con vector viral y, por lo tanto, se ha proporcionado la primera evidencia de que la inducción de respuestas inmunes contra la proteína de pico usando vectores virales brinda protección contra la enfermedad en seres humanos.

En los que recibieron dos dosis estándar, la eficacia frente a un COVID-19 sintomático primario fue consistente en las poblaciones de RU y Brasil, con el 60% y el 64% de eficacia respectivamente. La eficacia del 90% observada en aquellos que recibieron una dosis baja como principal en el RU fue sorprendentemente alta. Un contraste similar en eficacia entre los receptores de LD/SD y SD/SD con infecciones asintomáticas apoya la observación. El uso de una dosis baja para la preparación podría proporcionar sustancialmente más vacuna para su distribución en un momento de suministro limitado, y estos datos implican que esto no comprometerá la protección. Si bien una vacuna que podría prevenir la enfermedad COVID-19 tendría un beneficio sustancial para la salud pública, la prevención de la infección asintomática podría reducir la transmisión viral y proteger a las personas con problemas de salud

subyacentes que no responden a la vacunación, a las que no pueden vacunarse y aquellos que no tienen acceso a una vacuna, proporcionando un beneficio más amplio. Aquí mostramos que la eficacia contra la infección asintomática después de ChAdOx1 nCoV-19 es del 59% en los que recibieron una sensibilización de dosis baja y del 4% en los que recibieron dos dosis estándar.

Algunas autoridades reguladoras consideran que el límite inferior del intervalo de confianza para la eficacia debería ser superior al 20%, mientras que otras autoridades son más estrictas y anticipan un límite inferior del 30% para la licencia (Center for Biologics Evaluation and Research. Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19. 2020 (8 de noviembre de 2020)). Aquí se presentan datos que superan ambos umbrales.

Ejemplo 23. Exposición a AZD1222: protección después de la primera dosis de vacuna y efecto del intervalo de dosis en EV ≥ 15 días después de la segunda dosis.

Exposición a AZD1222

12021 participantes de los 4 estudios incluidos en la solicitud han recibido al menos una dosis de AZD1222. De estos participantes, 8266 (68.8%) han recibido 2 dosis de AZD1222 (véase la Tabla a continuación). En general y en el conjunto de análisis de eficacia primario, aproximadamente un tercio de los participantes tenían cada uno un intervalo de dosis en el rango de <6 semanas, 6 a 11 semanas o ≥ 12 semanas.

Parámetro		Cualquier Dosis para el Conjunto de Análisis de la Seguridad		SDSD + LDSD Seronegativo para el Conjunto de Análisis de la Eficacia	
		AZD1222 (N = 12021)	**Control (N = 11724)**	**AZD1222 (N = 5807)**	**Control (N = 5829)**
Nivel de Dosis[a], n (%)	LDSD	1516 (12.6)	1472 (12.6)	1367 (23.5)	1374 (23.6)
	LDLD	127 (1.1)	69 (0.6)	0	0
	SDSD	6568 (54.6)	6472 (55.2)	4440 (76.5)	4455 (76.4)
	SDLD	55 (0.5)	36 (0.3)	0	0
	LD	305 (2.5)	281 (2.4)	0	0
	SD	3450 (28.7)	3394 (28.9)	0	0
	Total	12021	11724	5807	5829
Intervalo de Dosis, n(%)	< 6 semanas	3412 (41.3)	3234 (40.2)	1702 (29.3)	1698 (29.1)
	6-8 semanas	680 (8.2)	604 (7.5)	568 (9.8)	527 (9.0)
	9-11 semanas	1558 (18.8)	1550 (19.3)	1444 (24.9)	1488 (25.5)
	≥ 12 semanas	2616 (31.6)	2661 (33.1)	2093 (36.0)	2116 (36.3)
	Total	8266	8049	5807	5829

[a] El nivel de dosis del grupo de control se decide por el nivel de dosis del grupo de vacuna correspondiente.
La fila total incluye el número de participantes sin datos faltantes para la característica correspondiente y se usó como el denominador para calcular los porcentajes para todas las categorías.

Protección después de la primera dosis de la vacuna

Se realizaron análisis exploratorios para investigar si la primera dosis inducía inmunidad protectora y cuál era la duración de la protección. El tiempo de seguimiento comenzó a los 22 días después de la primera dosis y se censuraron los participantes del análisis en el momento más temprano de cuando recibieron una segunda dosis o 12 semanas después de la dosis 1. Los resultados (véase la Tabla a continuación) indicaron que la primera dosis proporciona inmunidad protectora al menos hasta 12 semanas.

	Participantes con acontecimientos				**EV (%)**	**IC del 95%**
	AZD1222		**Control**			
	N	**n (%)**	**N**	**n (%)**		
Casos hasta la semana 12	7998	12 (0.15)	7982	44 (0.55)	73.00	(48.79, 85.76)

Tabla: Eficacia de la vacuna para la incidencia del primer

COVID-19 confirmado virológicamente del SARS-CoV-2 después de la primera dosis + 22 días y antes de la segunda dosis de la vacuna o 12 semanas después de la dosis 1

5807 participantes en el grupo AZD1222 para el SDSD + LDSD Seronegativo para el conjunto de análisis de eficacia tuvieron una duración mediana del seguimiento de 15 días después de la segunda dosis (es decir, el criterio de valoración para el criterio de valoración de eficacia principal) de 48.0 días (rango, 1 a 79 días) y desde la primera dosis de 132.0 días (rango, 41 a 158 días); 5829 participantes en el grupo de control tuvieron una mediana de duración de seguimiento de 15 días después de la segunda dosis de 48.0 días (rango, 1 a 79 días) y desde la primera dosis de 133.0 días (rango, 35 a 158 días).

Efecto del intervalo de dosis en EV ≥ 15 días después de la dosis 2

El conjunto de datos en el que se demostró la eficacia de un régimen de dos dosis contenía datos en un amplio rango de intervalos de dosis (4 a 26 semanas): El 29.3% tenían < 6 semanas, el 34.7% tenían 6-11 semanas, y el 36.0% tenían ≥ 12 semanas.

Se realizaron análisis de subgrupos de la eficacia de la vacuna por intervalo de dosis. De acuerdo con los datos de inmunogenicidad en los que se observaron aumentos en las respuestas de anticuerpos neutralizantes y de unión con un intervalo de dosificación aumentado, la eficacia se demostró con más certeza para intervalos de dosis de 8 a 12 semanas. Para el intervalo de dosificación del subgrupo con 8-11 semanas, la EV fue el 72.85%, IC al 95% (43.45, 86.97), para el subgrupo con intervalo de dosis > 11 semanas, fue del 81.90%, IC al 95% (59.93, 91.90). Los

análisis exploratorios de subgrupos mostraron una eficacia de la vacuna alrededor del 80% para intervalos de dosificación superiores a 11 semanas, pero se limitaron los datos y las estimaciones se asociaron con amplios intervalos de confianza.

Aunque en el presente documento se han descrito en detalle realizaciones ilustrativas de la invención, con referencia a los dibujos adjuntos, se entiende que la invención no se limita a esas realizaciones precisas y que un experto en la técnica puede realizar varios cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Tabla de secuencias

SEQ ID NO: 1	Secuencia de aminoácidos de proteína de pico de SARS-CoV2 (nCoV-19)
SEQ ID NO: 2	ChAdOx2: Vector viral basado en adenovirus de chimpancé C68
SEQ ID NO: 3	codón de secuencia de nucleótidos optimizado y revisado para eliminar las bases repetidas que codifican para la proteína de pico **sin** el tPA líder.
SEQ ID NO: 4	codón de secuencia de nucleótidos optimizado y revisado para eliminar las bases repetidas que codifican para la proteína de pico **con** el tPA líder.
SEQ ID NO: 5	secuencia de aminoácidos de tPA (mutante P->A)
SEQ ID NO: 6	secuencia de aminoácidos de tPA (P que se produce de manera natural)
SEQ ID NO: 7	secuencia de aminoácidos de tPA SEQ ID NO: 5 sin 'RR'
SEQ ID NO: 8	secuencia de aminoácidos de tPA SEQ ID NO: 6 sin 'RR'
SEQ ID NO: 9	secuencia de nucleótidos que codifica para tPA SEQ ID NO: 5, que ha sido optimizado

	con codones para uso de codones humanos
SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de la fusión de pico de tPA (tPA subrayado) (es decir, secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 4)
SEQ ID NO: 11	Secuencia de nucleótidos del genoma de SARS-CoV2 (nCoV 19) para la proteína de pico (Del número de registro MG772933.1)
SEQ ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de dominio de unión al receptor del pico de tPA
SEQ ID NO: 13	Secuencia de nucleótidos de dominio de unión al receptor del pico de tPA
SEQ ID NO: 14	Proteína de prefusión de pico de secuencia de aminoácidos con tPA
SEQ ID NO: 15	Proteína de prefusión de pico de secuencia de nucleótidos con tPA

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.