

VACUNAS CONTRA EL CORONAVIRUS Y MÉTODOS DE USO

[0001] REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0002] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/981.451, presentada el 25 de febrero de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/004.380, presentada el 2 de abril de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/028.404, presentada el 21 de mayo de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/033.349, presentada el 2 de junio de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/040.865, presentada el 18 de junio de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/046.415, presentada el 30 de junio de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/062.762, presentada el 7 de agosto de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/114.858, presentada el 17 de noviembre de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/130.593 presentada el 24 de diciembre de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/136.973 presentada el 13 de enero de 2021; la solicitud provisional estadounidense N.º 62/981.168, presentada el 25 de febrero de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/022.032, presentada el 8 de mayo de 2020; la solicitud provisional estadounidense N.º 63/056.996, presentada el 27 de julio de 2020; y la solicitud provisional estadounidense N.º 63/063.157, presentada el 7 de agosto de 2020. El contenido de cada una de estas solicitudes se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0003] LISTADO DE SECUENCIAS

[0004] La presente solicitud incluye un listado de secuencias presentado de manera electrónica como un archivo de texto denominado "104409_000596_SL.txt", creado el 24 de febrero de 2021 con un tamaño de 58.410 bytes. El listado de secuencias se incorpora en la presente por referencia.

[0005] CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a una vacuna contra el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) y a métodos de administración de la vacuna.

[0007] ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0008] La COVID-19, conocida previamente como enfermedad o neumonía por 2019-nCoV, surgió rápidamente como una amenaza mundial a la salud pública, que se unió al síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y al síndrome respiratorio de

Oriente Medio (MERS) en una cantidad creciente de enfermedades asociadas con los coronavirus que se trasladaron de los animales a las personas. Existe una necesidad inminente de respuestas médicas, tales como vacunas para combatir la propagación de tales coronavirus emergentes. Existen al menos siete coronavirus identificados que infectan humanos, incluidos MERS-CoV y SARS-CoV.

[0009] En diciembre de 2019, la ciudad de Wuhan en China se convirtió en el epicentro de un brote mundial de un coronavirus novedoso. Este coronavirus, SARS-CoV-2, se aisló y se secuenció a partir de células epiteliales de vías respiratorias de ser humano de pacientes infectados (Zhu, *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; Wu, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020). Los síntomas de la enfermedad pueden variar de casos similares a un resfrío leve a casos graves con neumonía potencialmente mortal (Huang, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020). La situación mundial evoluciona de manera dinámica, y el 30 de enero de 2020 la Organización Mundial de la Salud declaró a la COVID-19 como una emergencia de salud pública de importancia internacional (PHEIC).

[0010] BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0011] En la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican un antígeno espicular de SARS-CoV-2. De acuerdo con algunas formas de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2 codificado es un antígeno de consenso. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende: una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de la secuencia de ácidos nucleicos establecida en los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 2; la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 3; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 5; la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ

ID NO: 5; una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 6; o la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6. Además, en la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican un antígeno espicular de SARS-CoV-2, en donde el antígeno espicular de SARS-CoV-2 comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0012] En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de SARS-CoV-2 se incorpora a una partícula viral.

[0013] Además se proporcionan vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de SARS-CoV-2. En algunas formas de realización, el vector es un vector de expresión. La molécula de ácido nucleico puede estar ligada operativamente a un elemento regulador seleccionado de un promotor y una señal de poliadenilación. El vector de expresión puede ser un plásmido o un vector viral.

[0014] Se divulgan composiciones inmunogénicas que comprenden una cantidad eficaz del vector o la partícula viral. La composición inmunogénica puede comprender un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como, entre otros, un amortiguador. El amortiguador puede ser opcionalmente un amortiguador de solución salina-citrato de sodio. En algunas formas de realización, las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante.

[0015] Además, en la presente se proporcionan antígenos espiculares de SARS-CoV-2. De acuerdo con algunas formas de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2 es un antígeno de consenso. En algunas formas de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2 comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0016] Además, en la presente se proporcionan vacunas para prevenir o tratar la infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2). Las vacunas comprenden una cantidad eficaz de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores o los antígenos mencionados anteriormente. De acuerdo con algunas formas de realización, la vacuna comprende además un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. El excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico puede ser un amortiguador, opcionalmente, un amortiguador de solución salina-citrato de sodio. De acuerdo con algunas formas de realización, la vacuna comprende además un adyuvante.

[0017] Además, en la presente se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) en un sujeto que lo necesite. En algunas formas de realización, los métodos para inducir una respuesta inmunitaria comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas mencionados anteriormente. Además, en la presente se proporcionan métodos para proteger a un sujeto que lo necesite de una infección por SARS-CoV-2, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas mencionados anteriormente. Además, se proporcionan métodos para tratar una infección por SARS-CoV-2 en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas mencionados anteriormente. En cualquiera de estos métodos, la administración puede incluir al menos una de electroporación e inyección. De acuerdo con algunas formas de realización, la administración comprende administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección por vía intradérmica, intramuscular o subcutánea, opcionalmente,

seguida de electroporación. En algunas formas de realización de los métodos divulgados, se administra al sujeto una dosis inicial de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente, la dosis inicial es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. Además, los métodos pueden implicar la administración al sujeto de una dosis posterior de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico alrededor de cuatro semanas después de la dosis inicial, opcionalmente, en donde la dosis posterior es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. En aun otras formas de realización, los métodos implican la administración al sujeto de una o más dosis posteriores adicionales de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico al menos doce semanas después de la dosis inicial, opcionalmente, en donde la dosis posterior adicional es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. En cualquiera de estas formas de realización, se administra INO-4800 o un biosimilar de este.

[0018] Además, en la presente se proporcionan usos de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas divulgados en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) en un sujeto que lo necesite. Además, se proporcionan usos de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas divulgados en un método para proteger a un sujeto de una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2). Además, en la presente se proporcionan usos de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas divulgados en un método para tratar un sujeto que lo necesite contra una infección por SARS-CoV-2. De acuerdo con cualquiera de estos usos, la molécula de ácido nucleico, el vector, la composición inmunogénica, el antígeno o la vacuna se puede administrar al sujeto mediante al menos una de electroporación e inyección. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico, el vector, la composición inmunogénica, el antígeno o la vacuna se administra al sujeto por vía parenteral seguida de electroporación. En algunas formas de realización de los usos divulgados, se administra al sujeto una dosis inicial de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico, opcionalmente, la dosis inicial es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. Además, los métodos pueden implicar la

administración al sujeto de una dosis posterior de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico alrededor de cuatro semanas después de la dosis inicial, opcionalmente, en donde la dosis posterior es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. En aun otras formas de realización, los usos implican la administración al sujeto de una o más dosis posteriores adicionales de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico al menos doce semanas después de la dosis inicial, opcionalmente, en donde la dosis posterior adicional es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. En cualquiera de estas formas de realización, se administra INO-4800 o un biosimilar de este.

[0019] Además, en la presente se proporcionan usos de cualquiera o una combinación de las moléculas de ácido nucleico, los vectores, las composiciones inmunogénicas, los antígenos o las vacunas divulgados en la preparación de un medicamento. En algunas formas de realización, el medicamento sirve para tratar o proteger de una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2). En algunas formas de realización, el medicamento sirve para tratar o proteger de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2. En algunas formas de realización, el medicamento sirve para tratar o proteger de la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19), el síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o el síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C). **[0020]** Además, la invención se refiere a un método para detectar una

respuesta inmunitaria celular persistente en un sujeto, en donde el método comprende las etapas de: administrar a un sujeto que lo necesite una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de SARS-CoV-2; aislar células mononucleares periféricas (PBMC) del sujeto; estimular las PBMC aisladas con un antígeno espicular que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o un fragmento de esta que comprende al menos 20 aminoácidos; y detectar al menos uno de la cantidad de células que expresan citocinas y el nivel de expresión de citocinas. En una forma de realización, la etapa de detectar al menos uno de la cantidad de células que expresan citocinas y el nivel de expresión de citocinas se realiza mediante el uso de análisis Immunospot ligado a enzimas (ELISpot) o tinción de citocinas intracelulares (ICS) con

citometría de flujo.

[0021] En una forma de realización, se administra al sujeto una composición inmunogénica que comprende una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0022] BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] Las **Figuras 1A, 1B, 1C y 1D** ilustran el diseño y la expresión de constructos de vacunas de ADN sintético contra el SARS-CoV-2. La **Figura 1A** muestra un diagrama esquemático de constructos de vacunas de ADN sintético contra el SARS-CoV-2, pGX9501 (emparejado) y pGX9503 (valor atípico (OL)) que contienen la secuencia líder de IgE y el inserto de la proteína espicular del SARS-CoV-2 (“antígeno espicular de la covid-19” o “antígeno espicular-OL de la covid-19”). La **Figura 1B** muestra resultados de un ensayo de RT-PCR de un extracto de ARN a partir de células COS-7 transfectadas por duplicado con pGX9501 o pGX9503.

El ARN extraído fue analizado mediante RT-PCR con el uso de ensayos de PCR diseñados para cada diana y para mRNA de β -actina COS-7, utilizado como un gen de normalización de la expresión interna. C_T delta (ΔC_T) se calculó como el C_T de la diana menos el C_T de β -actina para cada concentración de transfección y se representa en comparación con el log de la masa de pADN transfectado (representado como media $\pm$ SD). La **Figura 1C** muestra un análisis de la expresión *in vitro* de la proteína espicular después de la transfección de linfocitos T 293 con plásmido de pGX9501, pGX9503 o MOCK mediante transferencia Western. Los lisados de linfocitos T 293 se resolvieron en un gel y se sondearon con una proteína espicular anti-SARS policlona. Las transferencias se despojaron y, luego, se sondearon con un control de carga anti- β -actina. La **Figura 1D** muestra tinción por inmunofluorescencia

in vitro de linfocitos T 293 transfectados con 3 µg/cavidad de pGX9501, pGX9503 o pVax (vector de control vacío). La expresión de la proteína espicular se midió con IgG de proteína espicular anti-SARS policlonal y anti-IgG secundario. Los núcleos celulares se sometieron a contratinción con DAPI. Las imágenes se capturaron mediante el uso del sistema de formación de imágenes celulares automatizado ImageXpress™ Pico.

[0024] La **Figura 2** ilustra un cribado de unión a IgG de un panel de antígenos de SARS-CoV-2 y SARS-CoV mediante el uso del suero de ratones tratados con INO-4800. Los ratones BALB/c fueron inmunizados el día 0 con 25 µg de INO-4800 o vector vacío pVAX (control), como se describe en los métodos. Unión al antígeno de proteína de IgG a diluciones de suero de 1:50 y 1:250 de los ratones el día 14. Los datos mostrados representan la media de valores de OD450 nm (media+SD) para cada grupo de 4 ratones.

[0025] Las **Figuras 3A, 3B, 3C y 3D** demuestran respuestas humorales al antígeno de la proteína S 1+2 y S del dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 en ratones BALB/c después de una sola dosis de INO-4800. Los ratones BALB/c fueron inmunizados el día 0 con las dosis indicadas de INO-4800 o vector vacío pVAX, como se describe en el Ejemplo 1. Se muestra la unión de IgG al antígeno de la proteína S1+2 del SARS-CoV-2 (**Figura 3A**) o el RBD del SARS-CoV-2 (**Figura 3B**) en diluciones en serie de suero de ratones el día 14. Los datos mostrados representan la media de valores de OD450 nm (media+SD) para cada grupo de 8 ratones (**Figura 3A y 3B**) y 5 ratones (**Figura 3C y 3D**). Títulos de valoración de unión de IgG en suero a la proteína S1+2 del SARS-CoV-2 (**Figura 3B**) y el RBD del SARS-CoV-2 (**Figura 3D**). Los datos representan 2 experimentos independientes.

[0026] Las **Figuras 4A y 4B** ilustran respuestas de anticuerpos neutralizantes después de la inmunización con INO-4800. Los ratones BALB/c (n de 5 por grupo) fueron inmunizados dos veces los días 0 y 14 con 10 µg de INO-4800. Se recolectó suero el día 7 después de la segunda inmunización y las diluciones de suero se incubaron con un pseudovirus que presenta la espícula del SARS-CoV-2 y se incubaron conjuntamente con linfocitos T ACE2-293T. La **Figura 4A** muestra la ID50 de neutralización (media±SD) en ratones sin tratamiento e inmunizados con INO-4800. La **Figura 4B** muestra unidades de luminiscencia relativa (RLU) para los sueros de ratones sin tratamiento y ratones vacunados con INO-4800, como se describe en los métodos. **[0027]** Las **Figuras 5A y 5B** muestran respuestas humorales a SARS-CoV-2 en cobayos Hartley después de una sola dosis de INO-4800. Los cobayos

Hartley fueron inmunizados el día 0 con 100 µg de INO-4800 o vector vacío pVAX, como se describe en el Ejemplo 1. La **Figura 5A** muestra la unión de IgG al antígeno de la proteína S del SARS-CoV-2 en diluciones en serie de suero el día 0 y 14. Los datos mostrados representan la media de valores de OD450 nm (media+SD) para los 5 cobayos. La **Figura 5B** muestra títulos de unión de IgG en suero (media±SD) a la proteína S del SARS-CoV-2 el día 14. Los valores P se determinaron mediante prueba de Mann-Whitney.

[0028] Las **Figuras 6A-6F** demostraron que los sueros de cobayos y ratones inmunizados con INO-4800 compiten con el receptor de ACE2 para la unión a la proteína espicular del SARS-CoV-2. La **Figura 6A** ilustra que el receptor de ACE2 soluble se une a la espícula de longitud completa del CoV-2 con una EC50 de 0,025 µg/ml. La **Figura 6B** ilustra que la IgG en suero purificada de ratones BALB/c (n de 5 por grupo) después de la segunda inmunización con INO-4800 produce una competencia significativa contra el receptor de ACE2. Las muestras de IgG en suero de los animales se realizaron por triplicado. La **Figura 6C** ilustra que las IgG purificadas de n=5 ratones el día 7 después de la segunda inmunización con INO-4800 presentan una competencia significativa contra el receptor de ACE2 que se une a la proteína S 1+2 del SARS-CoV-2. La concentración de ACE2 soluble para el ensayo de competencia es de ~0,1 µg/ml. Las barras representan la media y la desviación estándar de AUC. La **Figura 6D** ilustra cobayos Hartley inmunizados el día 0 y el día 14 con 100 µg de INO-4800 o vector vacío pVAX, como se describe en los métodos. El suero recolectado del día 28 (diluido a 1:20) se agregó a cavidades recubiertas con SARS-CoV-2 antes de agregar las diluciones en serie de la proteína ACE2. Se midió la detección de la unión de ACE2 a la proteína S del SARS-CoV-2. En este experimento, se utilizaron los sueros recolectados de 5 animales tratados con INO-4800 y 3 animales tratados con pVAX. La **Figura 6E** ilustra diluciones en serie de sueros de cobayos recolectados el día 21 que se agregaron a cavidades recubiertas con SARS-CoV-2 antes de agregar la proteína ACE2. Se midió la detección de la unión de ACE2 a la proteína S del SARS-CoV-2. En este experimento, se utilizaron los sueros recolectados de 4 cobayos tratados con INO-4800 y 5 cobayos tratados con pVAX. La **Figura 6F** representa que las IgG purificadas de n=5 ratones el día 14 después de la segunda inmunización con INO-4800 presentan competencia contra el receptor de ACE2 que se une a la proteína espicular del SARS-CoV-2 en comparación con las IgG agrupadas de ratones sin tratamiento. Los ratones sin tratamiento se mantuvieron en una única columna. Los ratones vacunados se analizaron por duplicado. Si las barras

de error no son visibles, el error es menor que el punto de datos.

[0029] Las **Figuras 7A-7D** ilustran la detección de anticuerpos reactivos a la proteína S del SARS-CoV-2 en el BAL de animales inmunizados con INO-4800. Los ratones BALB/c (n de 5 por grupo) fueron inmunizados los días 0 y 14 con INO-4800 o pVAX y se recolectó BAL el día 21 (**Figuras 7A y 7B**). Los cobayos Hartley (n de 5 por grupo) fueron inmunizados los días 0, 14 y 21 con INO-4800 o pVAX y se recolectó BAL el día 42 (**Figuras 7C y 7D**). El fluido del lavado broncoalveolar se evaluó por duplicado para detectar anticuerpos IgG específicos contra la proteína espicular del SARS-CoV-2 mediante ELISA. Los datos se presentan como títulos de valoración (**Figuras 7A y 7C**) y curvas de dilución de BAL con valores de OD 450 nm sin procesar (**Figuras 7B y 7D**). En las **Figuras 7A y 7C**, las barras representan el promedio de cada grupo y las barras de error, la desviación estándar. **p<0,01 mediante prueba U de Mann-Whitney.

[0030] La **Figura 8A-8C** muestra inducción de respuestas de linfocitos T en ratones BALB/c después de la administración de INO-4800. Los ratones BALB/c (n=5/grupo) fueron inmunizados con 2,5 o 10 µg de INO-4800. Las respuestas de linfocitos T se analizaron en los animales los días 4, 7, 10 (**Figuras 8A y 8B**) y el día 14 (**Figura 8C**). Las respuestas de linfocitos T se midieron mediante ELISpot de IFN-γ en esplenocitos estimulados durante 20 horas con grupos de péptidos superpuestos que abarcaban las proteínas espiculares de SARS-CoV-2 (**Figura 8A**), SARS-CoV (**Figura 8B**) o MERS-CoV (**Figura 8C**). Las barras representan la media+SD.

[0031] Las **Figuras 9 y 10** ilustran respuestas inmunitarias humores y celulares medidas en conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) tratados con INO-4800. Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISpot de IFN-γ de PBMC (**Figura 9**); ELISA de unión de IgG en suero (**Figura 10**).

[0032] Las **Figuras 11A-11E** ilustran respuestas inmunitarias humores a la proteína espicular del SARS-CoV-2 medidas en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800. Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISA de unión de IgG en suero.

[0033] Las **Figuras 12A-12G** ilustran respuestas inmunitarias humores a la proteína espicular de SARS y MERS medidas en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800. Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISA de unión de IgG en suero. (**Figura 12A-12G**; panel izquierdo, 1 mg de INO-4800; panel derecho, 2 mg de INO-4800).

[0034] Las **Figuras 13A-13C** ilustran respuestas inmunitarias medidas mediante

ELISpot de IFN- γ de PBMC en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800 después de la administración intradérmica de pADN los días 0 y 28 por vía intradérmica. Los resultados se muestran en la **Figura 13A** (péptidos espiculares de SARS CoV-2); **13B** (péptidos espiculares de SARS CoV); y **13C** (péptidos espiculares de MERS CoV).

[0035] Las **Figuras 14A y 14B** muestran el mapeo de los epítomos de linfocitos T después de la administración de INO-4800 a ratones BALB/c. Se estimularon esplenocitos durante 20 horas con grupos de mapeo de la matriz de péptidos del SARS-CoV-2. La **Figura 14A** demuestra respuestas de linfocitos T después de la estimulación con grupos de péptidos del SARS-CoV-2 de mapeo de la matriz. Las barras representan la media+SD de 5 ratones. La **Figura 14B** muestra el mapa de la proteína espicular del SARS-CoV-2 y la identificación de péptidos inmunodominantes en ratones BALB/c. Se incluye a fines de comparación un epítipo del SARS-CoV HLA-A2 inmunodominante conocido. La **Figura 14B** divulga las SEQ ID NO 26-35, respectivamente, en orden de aparición.

[0036] Las **Figuras 15A-15H** representan correlatos humorales de protección en compartimentos nasales y faríngeos. (**Figuras 15A-15D**) Correlación de copias de cADN Log10 por ml-1 de carga viral en la garganta el día 1 (**Figuras 15A, 15B**) y el día 3 (**Figuras 15C, 15D**) después de la exposición al SARS-CoV-2 con títulos de microneutralización (**Figuras 15A, 15C**) y títulos de valoración de unión de IgG al RBD (**Figuras 15B, 15D**). (**Figuras 15E-15H**) Mismo análisis para las cargas virales nasales. Los valores P y R contemplaron análisis de correlación por rangos de Spearman bilaterales y no paramétricos. Animales de control: círculos rojos rellenos; INO-4800 X1: círculos verdes rellenos; e INO-4800 X2: círculos azules rellenos.

[0037] La **Figura 16** ilustra el diagrama de flujo del estudio de fase I.

[0038] Las **Figuras 17A, 17B, 17C y 17D** ilustran la respuesta humoral de anticuerpos del estudio clínico de fase I. Se evaluó la respuesta humoral en el grupo de dosis de 1,0 mg y el grupo de dosis de 2,0 mg para determinar la capacidad para neutralizar virus vivo (n=18, 1,0 mg; n=19, 2,0 mg) (**Figura 17A**); unión a las regiones del RBD (**Figura 17B**); y unión a la proteína espicular entera (S1 y S2) (**Figura 17C**). Los títulos de valoración se calcularon como el título que exhibía una SD de OD 3,0 por encima del valor inicial; los títulos al inicio se establecieron en 1. En la **Figura 17D**, se evaluó la respuesta humoral en el grupo de dosis de 1,0 mg y el grupo de dosis de 2,0 mg para determinar la capacidad de unión a la proteína espicular entera (S1 y S2) (n=19, 1,0 mg; n=19, 2,0 mg). Los títulos de valoración se calcularon como el título que exhibía una SD de OD 3,0 por encima del valor inicial; los títulos al inicio se

establecieron en 1. Una respuesta a la neutralización de virus vivo fue una IC₅₀ en PRNT ≥ 10 . En todos los gráficos, las líneas horizontales representan la mediana y las barras representan el rango intercuartílico.

[0039] Las **Figuras 18A-18G** ilustran los resultados analíticos de la respuesta inmunitaria celular del estudio clínico de fase I. Se estimularon *in vitro* PBMC aisladas de individuos vacunados con el antígeno espicular del SARS-CoV-2. Se midió la cantidad de células capaces de secretar IFN-gamma en un ensayo de ELISpot estándar para el grupo de dosis de 1,0 mg y el grupo de dosis de 2,0 mg (**Figura 18A**). Las líneas horizontales representan las medianas y las barras representan rangos intercuartílicos. Como se muestra en la **Figura 18B**, los péptidos que abarcan la totalidad del antígeno espicular se dividieron en grupos y se evaluaron individualmente en ELISpot, donde los grupos se mapearon a regiones específicas del antígeno. Se muestran tres sujetos que ejemplifican la diversidad de las respuestas de los grupos y la magnitud asociada entre los sujetos. El gráfico circular representa la diversidad de la totalidad del grupo de dosis de 2,0 mg. Como se ilustra en la **Figura 18C**, la producción de citocinas específicas de la espícula del SARS-CoV-2 se midió a partir de linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo. Las barras representan la media de respuesta. La producción de citocinas se divide adicionalmente en la **Figura 18D** con CCR7 y CD45RA en estado de diferenciación de memoria central (CM), de memoria efectora (EM) o efectora (E) con datos que reflejan qué porcentaje de respuesta de citocinas en general se genera a partir de cuál grupo diferenciado. En la **Figura 18E**, se proporcionan gráficos circulares que representan la polifuncionalidad de los linfocitos T CD4+ y CD8+ para cada cohorte de dosis. En la **Figura 18F**, se ilustra la producción de IL-4 por parte de los linfocitos T CD4+ para cada cohorte de dosis. Las líneas horizontales representan la media de respuesta. Los gráficos representan todos los sujetos evaluables. Se realizaron análisis estadísticos en todos los conjuntos de datos emparejados. Aquellos que fueron significativos se indican dentro de la figura, si no están indicados en figura, significa que no tuvieron significancia estadística. La **Figura 18G** proporciona un mapa de calor de cada sujeto en el grupo de dosis de 2,0 mg y el porcentaje de su respuesta de ELISpot dedicada a cada grupo que abarca el antígeno espicular del SARS-CoV-2.

[0040] La **Figura 19** ilustra los eventos adversos locales y sistémicos relacionados con la fase I con una gravedad leve (grado 1), moderada (grado 2), grave (grado 3) y potencialmente mortal (grado 4).

[0041] La **Figura 20** proporciona datos complementarios para la respuesta

inmunitaria humoral. Tres muestras de convalecientes (los 3 sintomáticos, pero sin hospitalización), evaluadas mediante el ensayo de ELISpot, presentaron respuestas de linfocitos T más bajas, con una mediana de 33, que el grupo de dosis de 2,0 mg la semana 8.

[0042] La **Figura 21** proporciona datos complementarios de ImmunoSpot ligado a enzimas (ELISpot).

[0043] Las **Figuras 22A-22F** representan respuestas humorales y celulares en *Macaca mulatta* vacunados con INO-4800. Descripción del estudio (**Figura 22A**). Anticuerpos IgG específicos contra la espícula (**Figura 22B**), el RBD (**Figura 22C**) y neutralizadores de virus vivo (**Figura 22D**) medidos en suero a partir de *Macaca mulatta* que recibieron 1 o 2 dosis de INO-4800 o que no fueron vacunados (control). Las líneas representan las medias geométricas. Respuestas inmunitarias celulares en *Macaca mulatta* vacunados con INO-4800. La secreción del interferón gamma (IFN γ) específico contra la espícula del SARS-CoV-2 a partir de PBMC se midió en *Macaca mulatta* que recibieron 1 o 2 dosis de INO-4800 o que no fueron vacunados (control) antes (**Figura 22E**) y después (**Figura 22F**) de la exposición. Las PBMC se estimularon con 5 grupos de péptidos separados que abarcaban la proteína espicular y las frecuencias de SFU se midieron en respuesta a cada grupo agregado. Las líneas representan las medias.

[0044] Las **Figuras 23A-23C** ilustran el cambio en el peso, la temperatura y la hemoglobina en los animales durante el estudio. Los animales recibieron una (INO-4800X1) o dos (INO-4800X2) dosis de INO-4800 o no fueron vacunados (control). El porcentaje de cambio en el peso corporal (**Figura 23A**), la temperatura (**Figura 23B**) y los recuentos de hemoglobina (**Figura 23C**) de animales individuales se registraron y se plasmaron en un gráfico en los puntos temporales indicados antes y después de la exposición. Las líneas representan la media (**Figura 23A**) y la media geométrica (**Figura 23B y Figura 23C**) de valor para cada grupo. **[0045]** Las **Figuras 24A-**

24F ilustran las cargas virales de las vías respiratorias superiores detectadas mediante RT-qPCR después de la exposición a SARS-CoV-2. Los animales recibieron una (INO-4800X1) o dos (INO-4800X2) dosis de INO-4800 o no fueron vacunados (control). La carga viral se graficó como copias de cADN Log₁₀/ml para cada animal en hisopados faríngeos (**Figuras 24A-24C**) e hisopados nasales (**Figuras 24D-24F**). (**Figuras 24A y 24D**) Las líneas representan las medias geométricas de grupos con 95 % de CI. Área bajo la curva (AUC) de cargas virales para hisopados faríngeos (**Figura 24B**) e hisopados nasales (**Figura 24E**) para cada grupo experimental. Cargas virales

máximas medidas en cada animal durante el período de exposición para hisopados faríngeos (**Figura 24C**) e hisopados nasales (**Figura 24F**). LLOQ (límite inferior de la cuantificación, 3,80 copias log/ml) y LLOD (límite inferior de detección, 3,47 copias log/ml). Las muestras positivas detectadas por debajo del LLOQ recibieron el valor de 3,80 copias log/ml. * $p \leq 0,05$ con la prueba t de Mann-Whitney.

[0046] Las **Figuras 25A-25F** ilustran las cargas virales subgenómicas de las vías respiratorias superiores detectadas mediante RT-qPCR después de la exposición al SARS-CoV-2. Los animales recibieron una (INO-4800X1) o dos (INO-4800X2) dosis de INO-4800 o no fueron vacunados (control). La carga viral se graficó como copias de cADN Log10/ml para cada animal en hisopados faríngeos (**Figuras 25A-25C**) e hisopados nasales (**Figuras 25D-25F**). (**Figuras 25A y 25D**) Las líneas representan las medias geométricas de grupos con 95 % de CI. Área bajo la curva (AUC) de cargas virales para hisopados faríngeos (**Figura 25B**) e hisopados nasales (**Figura 25E**) para cada grupo experimental. Cargas virales máximas medidas en cada animal durante el período de exposición para hisopados faríngeos (**Figura 25C**) e hisopados nasales (**Figura 25F**). LLOQ (4,11 copias log/ml) y LLOD (3,06 copias log/ml). Las muestras positivas detectadas por debajo del LLOQ recibieron el valor de 3,81 copias log/ml.

[0047] Las **Figuras 26A-26D** ilustran las cargas virales de las vías respiratorias inferiores detectadas mediante RT-qPCR después de la exposición al SARS-CoV-2. Los animales recibieron una (INO-4800X1) o dos (INO-4800X1) dosis de INO-4800 o no fueron vacunados (control). Las cargas virales genómicas y subgenómicas de SARS-CoV-2 se midieron en animales individuales en lavado broncoalveolar (BAL (**Figuras 26A y 26B**)) y las muestras de tejido pulmonar (**Figuras 26C y 26D**) se recolectaron en la necropsia (6-8 días después de la exposición). Las barras representan medianas de grupo. Los LLOQ y LLOD del ensayo se proporcionan en la sección de métodos.

[0048] La **Figura 27** ilustra el ARN viral en el tejido del animal después de la exposición. Los animales recibieron una (INO-4800X1) o dos (INO-4800X2) dosis de INO-4800 o no fueron vacunados (control). Las cargas virales de SARS-CoV-2 se midieron en animales individuales en muestras de tejido recolectadas en la necropsia (6-8 DPC). Las barras representan la mediana de grupo con 95 % de CI. Las muestras de tejido positivas detectadas por debajo del límite de cuantificación (LoQ) de 4,76 copias log/ml recibieron el valor de 5 copias/μL, lo que equivale a 4,46 copias log/g, mientras que las muestras no detectadas recibieron el valor de <2,3 copias/μL, lo que

equivale al límite inferior de detección del ensayo (LoD), lo que equivale a 4,76 copias log/g.

[0049] La **Figura 28** muestra una histopatología representativa (tinción H&E) y la presencia de ARN viral de SARS-CoV-2 (tinción RNAScope ISH) en animales vacunados con 1 dosis (superior), 2 dosis (medio) o no vacunados (inferior). Los animales vacunados con una 1 dosis presentaron neumonía alveolar e intersticial (*) multifocal de mínima a leve, con mayor gravedad en el animal 10A. Los animales restantes del grupo 1 presentaron infiltrados inflamatorios (*) mínimos/leves. Además, se observó manguito perivascular leve (puntas de flecha) y se mostró ARN viral mediante ISH dentro de las lesiones (flechas), abundantemente en el animal 10A y en menores cantidades en los animales 30A, 24A, 21A y 38A (flechas). Los animales vacunados con 2 dosis presentaron neumonía alveolar e intersticial (*) multifocal de mínima a leve junto con manguito perivascular mínimo (puntas de flecha). Se observaron cantidades pequeñas de ARN viral mediante ISH dentro de las lesiones de los animales 9A, 45A, 33A y 13A (flechas). Los animales no vacunados presentaron neumonía alveolar e intersticial (*) multifocal (*) moderada, con presencia de abundante ARN viral dentro de las lesiones de todos los animales (flechas).

[0050] Las **Figuras 29A-29G** ilustran la carga de la enfermedad pulmonar medida mediante histopatología y tomografía computarizada después de la exposición al SARS-CoV-2. Puntuación histopatológica total (**Figura 29A**) y análisis de imágenes del área teñida positivamente en secciones etiquetadas por RNAScope ISH para ARN viral (**Figura 29B**). La **Figura 29C** proporciona una ilustración de un mapa de calor de puntuación histopatológica para cada parámetro para los animales individuales. Puntuación de CT total (**Figura 29E**). Puntuaciones de radiología de CT para animales individuales (**Figuras 29D-29G**). **Figura 29D**: La magnitud de la anomalía como un porcentaje del pulmón dañado. **Figura 29E**: El patrón de la enfermedad COVID con puntuación en función de la presencia de nódulos, opacidad en vidrio esmerilado y consolidación. **Figura 29F**: Clasificación de zona (el pulmón se divide en 12 zonas y a cada zona que presenta anomalías se le atribuye 1 punto). **Figura 29G**: Puntuación total de CT acumulada (patrón + puntuaciones de zona). Las líneas en los gráficos representan la mediana de valor de grupo. * $p \leq 0,05$ con prueba t de Mann-Whitney.

[0051] La **Figura 30** ilustra un ejemplo representativo de anomalías pulmonares identificadas en imágenes provenientes de tomografías computarizadas. Las imágenes representan animales que no recibieron una vacuna (control): 8A [A], 25A [B], 28A [C], 14A [D], 50A [E]; animales que recibieron una sola dosis de una vacuna INO-4800:

10A [F], 21A [G], 38A [H]; animales que recibieron dos dosis de vacuna INO-4800: 21A [I], 33A [J]. Las flechas indican áreas de opacidad en vidrio esmerilado y áreas de consolidación. Las imágenes de macacos sin características anormales no se muestran.

[0052] La **Figura 31A** a **Figura 31F** representan imágenes de ELISpot de esplenocitos de ratón IFN- γ + después de la estimulación con antígeno de SARS-CoV-2 y SARS. Los ratones fueron inmunizados el día 0 y se recolectaron los esplenocitos en los puntos temporales indicados. Las células que secretan IFN γ en el bazo de los animales inmunizados se enumeraron mediante ensayo ELISpot. Las imágenes representativas muestran unidades formadoras de manchas de IFN γ específicas de SARS-CoV-2 (**Figura 31A** a **Figura 31C**) y específicas de SARS-CoV (**Figura 31D** a **Figura 31F**) en la población de esplenocitos los días 4, 7 y 10 después de la inmunización. Las imágenes se capturaron mediante lector de CTL ImmunoSpot.

[0053] La **Figura 32A** y la **Figura 32B** representan análisis por citometría de flujo de poblaciones de linfocitos T que producen IFN- γ tras la estimulación con la proteína S del SARS-CoV-2. Los esplenocitos recolectados a partir de ratones BALB/c y C57BL/6 14 días después del tratamiento con pVAX o INO-4800 se prepararon en suspensiones celulares individuales. Las células fueron estimuladas durante 6 horas con grupos de péptidos superpuestos del SARS-CoV-2. **Figura 32A:** Estrategia de regulación de linfocitos T CD4+ y CD8+; se regularon singletes en (i), luego, linfocitos (ii) seguidos por linfocitos CD45+ vivos (iii). A continuación, se regularon linfocitos CD3+ (iv) y de esa población se regularon linfocitos T CD4+ (v) y CD8+ (vi). Se regularon linfocitos IFN γ + a partir de poblaciones de linfocitos T CD4+ (vii) y CD8+ (viii). **Figura 32B:** Se representa el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ que producen IFN γ . Las barras representan la media +SD. En este estudio se utilizaron 4 ratones BALB/c y 4 C57BL/6. * $p < 0,05$, prueba de Mann Whitney. **[0054]** Las **Figuras 33A** a **33H** representan respuestas inmunitarias celulares y humorales en *Macaca mulatta*. **Figura 33A:** Descripción del estudio que muestra el régimen de vacunación y los puntos temporales de extracción de sangre. **Figura 33B:** Esquema de la proteína espicular del SARS-CoV-2. **Figura 33C:** Unión de IgG al antígeno de la proteína de ECD S1+S2, S1, de RBD y S2 del SARS-CoV-2 en sueros de NHP diluidos en serie recolectados las semanas 0, 2, 6, 12 y 15. Los datos representan la media de títulos de valoración para cada NHP individual. (D&E) Ensayo de pseudoneutralización mediante el uso de sueros de NHP, que muestra la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos contra el SARS-CoV-2 contra las variantes D614 (**Figura**

33D) y G614 (**Figura 33E**) del SARS-CoV-2. **Figura 33F** y **Figura 33G**: El suero recolectado la semana 6 de NHP vacunados con INO-4800 inhibió la unión a ACE2. **Figura 33F**: Ensayo de competencia de ACE2 a base de placas. **Figura 33G**: Ensayo de inhibición de ACE2 a base de flujo que muestra la inhibición de la unión a ACE2 en sueros de NHP diluidos en serie. **Figura 33H**: Las respuestas de linfocitos T se midieron mediante ELISpot de IFN- γ en PBMC recolectadas las semanas 0, 2, 6 y 15 estimuladas durante 20 h con grupos de péptidos superpuestos que abarcaban la proteína espicular del SARS-CoV-2. Las barras representan la media+SD.

[0055] La **Figura 34** representa la reactividad cruzada de IgG en suero contra la proteína espicular del SARS-CoV y MERS-CoV. La unión de IgG se midió en suero de *Macaca mulatta* vacunados con INO-4800 al antígeno de la proteína S1 del SARS-CoV y al antígeno de la proteína S1 del MERS-CoV.

[0056] La **Figura 35** representa la IgG de lavado broncoalveolar (BAL) reactiva a los antígenos de la proteína S del SARS-CoV-2. Las muestras de BAL recolectadas de animales vacunados se evaluaron para detectar la unión de IgG reactiva al SARS-CoV-2 a la proteína espicular de longitud completa del SARS-CoV-2 y el dominio RBD.

[0057] La **Figura 36A** y la **Figura 36B** representan datos experimentales de ejemplo que demuestran la reactividad cruzada de la respuesta celular a la proteína espicular del SARS-CoV y MERS-CoV. Las respuestas de PBMC se analizaron mediante ELISpot de IFN γ después de la estimulación con grupos de péptidos superpuestos que abarcaban la proteína espicular del SARS-CoV-1 (**Figura 36A**) y la proteína espicular del MERS-CoV (**Figura 36B**). Las barras representan la media+SD.

[0058] La **Figura 37A** a **Figura 37C** representan experimentos de ejemplo que demuestran la recuperación de respuestas inmunitarias humorales después de la exposición al virus. **Figura 37A**: Descripción del estudio. **Figura 37B**: ELISA de unión de IgG. Unión de IgG al antígeno de la proteína S1+S2 del SARS-CoV-2 y el RBD del SARS-CoV-2 en sueros de NHP diluidos en serie recolectados antes de la exposición, durante la exposición y después de la exposición. **Figura 37C**: Ensayo de pseudoneutralización mediante el uso de sueros de NHP, que muestra la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos contra el SARS-CoV-2 contra las variantes D614 y G614 del SARS-CoV-2 antes y después de la exposición al virus en animales vacunados con INO-4800 (paneles superiores) y animales sin tratar (paneles inferiores).

[0059] La **Figura 38** representa experimentos de ejemplo que demuestran la recuperación de respuestas inmunitarias celulares después de la exposición al virus.

Las respuestas de los linfocitos T se analizaron mediante ELISpot de IFN γ en PBMC estimuladas con grupos de péptidos superpuestos que abarcaban la proteína espicular del SARS-CoV-2. Las barras representan la media+SD. Las respuestas de los linfocitos T se analizaron mediante ELISpot de IFN γ en PBMC aisladas antes y después de la exposición al virus SARS-CoV-2. Panel izquierdo: animales sin tratar; panel derecho: animales vacunados con INO-4800.

[0060] La **Figura 39** representa experimentos de ejemplo que demuestran la recuperación de respuestas inmunitarias celulares después de la exposición al virus en *Macaca mulatta* individuales. Las respuestas celulares se analizaron antes y después de la exposición mediante ELISpot de IFN γ en PBMC estimuladas con grupos de péptidos superpuestos que abarcaban la proteína espicular del SARS-CoV-2. Panel derecho: animales sin tratar; panel izquierdo: animales vacunados con INO-4800.

[0061] Las **Figuras 40A a 40F** representan cargas virales en el fluido BAL e hisopados nasales después de la exposición al virus. En la semana 17, los *Macaca mulatta* sin tratar y los inmunizados con INO-4800 (5 por grupo) se expusieron mediante administración por vía intranasal e intratraqueal a $1,1 \times 10^4$ PFU de SARS-CoV-2 (cepa aislada US-WA1). **Figura 40A y Figura 40D**: Se midieron las copias de sgRNA log/ml en BAL (**Figura 40A**) y copias de NS/hisopado (**Figura 40D**) en múltiples puntos temporales después de la exposición en animales sin tratar (paneles izquierdos) y vacunados con INO-4800 (paneles derechos). **Figura 40B y Figura 40E**: Cargas virales máximas (entre los días 1 a 7) en BAL (**Figura 40B**) y NS (**Figura 40E**) después de la exposición. **Figura 40C y Figura 40F**: ARN viral en BAL y NS el día 7 después de la exposición. Las líneas azules y rojas reflejan la mediana de las cargas virales. Se proporcionan los valores P de la prueba de Mann-Whitney (**Figura 40B y Figura 40C**).

[0062] DESCRIPCIÓN DETALLADA DE FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[0063] Definiciones

[0064] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel **medio**. En caso de conflictos, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones. A continuación se describen métodos y materiales preferidos, aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la puesta en práctica o en pruebas de la presente invención. Todas publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras

referencias mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad. Los materiales, métodos y ejemplos divulgados en la presente son solo ilustrativos y no limitativos.

[0065] La expresión “que comprende” pretende incluir ejemplos incluidos en las expresiones “que consiste esencialmente en” y “que consiste en”; de manera similar, la expresión “que consiste esencialmente en” pretende incluir ejemplos incluidos en la expresión “que consiste en”. La presente divulgación además contempla otras formas de realización “que comprenden”, “que consisten en” y “que consisten esencialmente en” las formas de realización o los elementos presentados en la presente, ya sea que se establezca de manera explícita o no.

[0066] Cabe destacar que ciertas características de los materiales y métodos, que, para una mayor claridad, se describen en la presente en el contexto de formas de realización separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola forma de realización. Por el contrario, diversas características de los materiales y métodos, que, para mayor brevedad, se describen en el contexto de una sola forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

[0067] Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0068] La expresión “alrededor de” utilizada en referencia a rangos numéricos, cortes o valores específicos se utiliza para indicar que los valores mencionados pueden variar hasta 10 % del valor enumerado. Por lo tanto, la expresión “alrededor de” se usa para abarcar variaciones de $\pm 10\%$ o menos, variaciones de $\pm 5\%$ o menos, variaciones de $\pm 1\%$ o menos, variaciones de $\pm 0,5\%$ o menos o variaciones de $\pm 0,1\%$ o menos del valor especificado. Cuando se expresan valores como aproximaciones mediante el uso del antecedente “alrededor de”, se entenderá que el valor particular forma otra forma de realización. La referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0069] Como se usa en la presente, “adyuvante” significa cualquier molécula agregada a la vacuna descrita en la presente para mejorar la inmunogenicidad del antígeno.

[0070] Como se usa en la presente, “anticuerpo” significa un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE o fragmentos, fragmentos o derivados de estos, incluidos Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos

biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de estos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado de la muestra de suero de un mamífero, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo purificado por afinidad o mezclas de estos que exhiben suficiente especificidad de unión a un epítipo deseado o una secuencia derivada de este.

[0071] El término “biosimilar” (de un producto/fármaco biológico de referencia aprobado, es decir, fármaco indicado de referencia) se refiere a un producto biológico que es altamente similar al producto de referencia pese a diferencias menores en componentes clínicamente inactivos sin diferencias clínicamente significativas entre el biosimilar y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia, en función de datos derivados de (a) estudios analíticos que demuestran que el producto biológico es altamente similar al producto de referencia pese a diferencias menores en componentes clínicamente inactivos; (b) estudios con animales (incluso la evaluación de la toxicidad); y/o (c) un estudio o estudios clínicos (incluso la evaluación de inmunogenicidad y la farmacocinética o la farmacodinámica) suficientes para demostrar seguridad, pureza y potencia en una o más condiciones apropiadas de uso para el que el producto de referencia tiene autorización y se pretende que se use y para el que se busca la autorización del biosimilar. El biosimilar puede ser un producto intercambiable que se puede sustituir por el producto de referencia en la farmacia sin la intervención del recetador. Para cumplir con el estándar adicional de “intercambiabilidad”, se pretende que el biosimilar produzca el mismo resultado clínico que el producto de referencia en cualquier paciente determinado y, si el biosimilar se administra más de una vez a un individuo, el riesgo en términos de seguridad o disminución de la eficiencia al alternar o cambiar el uso entre el biosimilar y el producto de referencia no es mayor que el riesgo al usar el producto de referencia sin dicha alternación o cambio. El biosimilar utiliza los mismos mecanismos de acción para las condiciones de uso propuestas en la medida en que se conozcan los mecanismos del producto de referencia. La condición o las condiciones de uso indicadas, recomendadas o sugeridas en las indicaciones propuestas para el biosimilar fueron aprobadas para el producto de referencia. La vía de administración, la forma de dosificación y/o la concentración del biosimilar es la misma que la del producto de referencia y el biosimilar se elabora, se procesa, se empaqueta o se manipula en una instalación que cumple con los estándares diseñados para asegurar que el biosimilar continúe siendo seguro, puro y potente. El biosimilar puede incluir modificaciones menores en la secuencia de aminoácidos cuando se compara con el producto de referencia, tal como truncamientos del terminal N o C que no se espera que cambien

el rendimiento del biosimilar.

[0072] Como se usa en la presente, “secuencia codificante” o “ácido nucleico codificante” se refiere a los ácidos nucleicos (molécula de ADN o ARN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante puede incluir además señales de iniciación y terminación ligadas operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero al que se administra el ácido nucleico.

[0073] Como se usa en la presente, “complemento” o “complementario” significa un emparejamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

[0074] Como se usa en la presente, “consenso” o “secuencia de consenso” puede significar una secuencia de ácidos nucleicos sintética, o secuencia de polipéptidos correspondiente, construida en función del análisis de una alineación de múltiples subtipos de un antígeno particular. La secuencia se puede utilizar para inducir una amplia inmunidad contra múltiples subtipos, serotipos o cepas de un antígeno particular. Los antígenos sintéticos, tales como proteínas de fusión, pueden manipularse para generar secuencias de consenso (o antígenos de consenso).

[0075] Como se usan de manera indistinta en la presente, “electroporación”, “electropermeabilización” o “mejora electrocinética” (“EP”) significa el uso de un pulso de campo eléctrico de transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que las biomoléculas, tales como plásmidos, oligonucleótidos, siARN, fármacos, iones y agua pasen de un lado de la membrana celular al otro.

[0076] Como se usa en la presente, “fragmento” significa una secuencia de ácidos nucleicos o una porción de esta que codifica un polipéptido que puede provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. Los fragmentos pueden ser fragmentos de ADN seleccionados de al menos una de las diversas secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de proteína establecidos más adelante.

[0077] “Fragmento” o “fragmento inmunogénico” con respecto a las secuencias de polipéptidos se refiere a un polipéptido que puede provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de manera cruzada con un antígeno de SARS-CoV-2 de cepa de tipo silvestre de longitud completa. Los fragmentos de proteínas de consenso pueden comprender al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al

menos 90 % o al menos 95 % de una proteína de consenso. En algunas formas de realización, los fragmentos de proteínas de consenso pueden comprender al menos 20 aminoácidos o más, al menos 30 aminoácidos o más, al menos 40 aminoácidos o más, al menos 50 aminoácidos o más, al menos 60 aminoácidos o más, al menos 70 aminoácidos o más, al menos 80 aminoácidos o más, al menos 90 aminoácidos o más, al menos 100 aminoácidos o más, al menos 110 aminoácidos o más, al menos 120 aminoácidos o más, al menos 130 aminoácidos o más, al menos 140 aminoácidos o más, al menos 150 aminoácidos o más, al menos 160 aminoácidos o más, al menos 170 aminoácidos o más, al menos 180 aminoácidos o más, al menos 190 aminoácidos o más, al menos 200 aminoácidos o más, al menos 210 aminoácidos o más, al menos 220 aminoácidos o más, al menos 230 aminoácidos o más o al menos 240 aminoácidos o más de una proteína de consenso.

[0078] Como se usa en la presente, la expresión “constructo genético” se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante incluye señales de iniciación y terminación ligadas operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico. Como se usa en la presente, la expresión “forma expresable” se refiere a constructos génicos que contienen los elementos reguladores necesarios ligados operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína de manera que, cuando se encuentra presente en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

[0079] Como se usa en la presente en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, “idéntico/a” o “identidad” significa que las secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos que son iguales a lo largo de una región especificada. El porcentaje se puede calcular al alinear de manera óptima las dos secuencias, comparar las dos secuencias a lo largo de la región especificada, determinar la cantidad de posiciones en las que ocurre el residuo idéntico en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividir la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la región especificada, y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. En los casos en que las dos secuencias tienen longitudes diferentes o la alineación produce uno o más extremos escalonados y la región especificada de comparación incluye solamente una secuencia única, los residuos de la secuencia única se incluyen en el denominador, pero no en el numerador, del cálculo. Al comparar el ADN y el

ARN, la timina (T) y el uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identidad se puede llevar a cabo manualmente o mediante el uso de un algoritmo de secuencia informático tal como BLAST o BLAST 2.0.

[0080] Como se usa en la presente, “respuesta inmunitaria” significa la activación del sistema inmunitario de un huésped, por ejemplo, el de un mamífero, en respuesta a la introducción de un antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser en forma de respuesta celular o humoral o ambas.

[0081] Como se usa en la presente, “ácido nucleico”, “oligonucleótido”, “polinucleótido” o “molécula de ácido nucleico” significa al menos dos nucleótidos ligados covalentemente entre sí. La representación de una cadena simple también define la secuencia de la cadena complementaria. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una cadena simple representada. Se pueden usar muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo propósito que un ácido nucleico determinado. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca sustancialmente ácidos nucleicos idénticos y complementos de estos. Una cadena simple proporciona una sonda que se puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación estrictas. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación estrictas.

[0082] Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios o pueden contener porciones de una secuencia monocatenaria o una bicatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como cADN, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina.

Los ácidos nucleicos se pueden obtener a través de métodos de síntesis química o a través de métodos recombinantes.

[0083] Como se usa en la presente, “ligado/a operativamente” significa que la expresión de un gen está bajo el control de un promotor con el que está conectado espacialmente. Un promotor se puede ubicar en la posición 5' (secuencia arriba) o 3' (secuencia abajo) de un gen en su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen del que se deriva el promotor. Como se sabe en la técnica, la variación de esta distancia se puede adaptar sin pérdida de la función del promotor.

[0084] Como se usa en la presente, un “péptido”, una “proteína” o un “polipéptido” puede significar una secuencia ligada de aminoácidos y puede ser natural, sintética o

una modificación o combinación de natural y sintética.

[0085] Como se usa en la presente, “promotor” significa una molécula sintética o natural que es capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras de la transcripción específicas para potenciar aún más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de esta. Un promotor también puede comprender elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse a una distancia de hasta varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivar de fuentes que incluyen virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico de manera constitutiva o diferencial con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión o, con respecto a la etapa de desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos, tales como el estrés fisiológico, patógenos, iones de metal o agentes inductores. Los ejemplos representativos de promotores incluyen el promotor de bacteriófago T7, el promotor de bacteriófago T3, el promotor SP6, el promotor-operador lac, el promotor tac, el promotor tardío de SV40, el promotor temprano de SV40, el promotor de RSV-LTR y el promotor de CMV IE.

[0086] “Péptido de señal” y “secuencia líder” se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a una secuencia de aminoácidos que se puede ligar en el terminal amino de una proteína del SARS-CoV-2 establecida en la presente. Los péptidos de señal/las secuencias líderes normalmente dirigen la localización de una proteína. Preferentemente, los péptidos de señal/las secuencias líderes que se usan en la presente facilitan la secreción de la proteína a partir de la célula en la que se produce. Los péptidos de señal/las secuencias líderes a menudo se escinden del resto de la proteína, a veces denominada proteína madura, tras la secreción de la célula. Los péptidos de señal/las secuencias líderes están ligados al terminal N de la proteína.

[0087] Como se usa en la presente, “sujeto” puede significar un mamífero que desea o necesita ser inmunizado con una vacuna o composición inmunogénica descrita en la presente. El mamífero puede ser un ser humano, un chimpancé, un cobayo, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un ratón, un conejo o una rata.

[0088] Como se usa en la presente, “sustancialmente idéntica” puede significar que una primera y una segunda secuencia de aminoácidos están al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a lo largo de una región de

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o más aminoácidos. Sustancialmente idéntica también puede significar que una primera secuencia de ácidos nucleicos y una segunda secuencia de ácidos nucleicos están al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a lo largo de una región de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o más nucleótidos.

[0089] Como se usa en la presente, “tratamiento” o “tratar” puede significar la protección de un animal de una enfermedad mediante medios para prevenir, suprimir, reprimir o eliminar completamente la enfermedad. Prevenir la enfermedad implica administrar una composición inmunogénica o una vacuna de la presente invención a un animal antes de la aparición de la enfermedad. Suprimir la enfermedad implica administrar una composición inmunogénica o una vacuna de la presente invención a un animal después de la inducción de la enfermedad, pero antes de su aparición clínica. Reprimir la enfermedad implica administrar una composición inmunogénica o una vacuna de la presente invención a un animal después de la aparición clínica de la enfermedad.

[0090] Como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, la expresión “clínicamente comprobado/a” (usado de manera independiente o para modificar los términos “seguro/a” y/o “eficaz”) significa la comprobación mediante un ensayo clínico, en donde el ensayo clínico cumplió con los estándares de aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, la EMA o una agencia reguladora nacional correspondiente. Por ejemplo, se pueden proporcionar pruebas a través de los ensayos clínicos descritos en los ejemplos proporcionados en la presente.

[0091] La expresión “seguro clínicamente comprobado”, relacionada con una dosis, un régimen de dosis, un tratamiento o un método con un antígenos del SARS-CoV-2 (por ejemplo, un antígeno espicular del SARS-CoV-2 administrado como pGX9501 o INO-4800 o un biosimilar de este) se refiere a una relación riesgo:beneficio favorable con una frecuencia aceptable y/o gravedad aceptable de eventos adversos emergentes del tratamiento (denominados AE o TEAE) en comparación con el tratamiento de referencia o con otro factor comparable. Un evento adverso es un incidente médico inadecuado en un paciente al que se le administró un fármaco. Un

índice de seguridad es la incidencia de eventos adversos (AE) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) clasificado según los Criterios comunes de toxicidad de eventos adversos CTCAE v4.03.

[0092] Como se usan en la presente, las expresiones “eficacia clínicamente comprobada” y “eficaz clínicamente comprobado” en el contexto de una dosis, un régimen de dosis, un tratamiento o un método se refieren a la efectividad de una dosis, un régimen de dosis o un tratamiento en particular. La eficacia puede medirse en función del cambio en el transcurso de la enfermedad en respuesta a un agente de la presente invención. Por ejemplo, un antígeno del SARS-CoV-2 (por ejemplo, un antígeno espicular del SARS-CoV-2 administrado como pGX9501 o INO-4800 o un biosimilar de este) se administra a un paciente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para inducir una mejora, preferentemente, una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleje la gravedad de la enfermedad que se está tratando. Diversos indicadores que reflejan el grado de la enfermedad o afección del sujeto se pueden evaluar para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. Tales indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores reconocidos clínicamente de la gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones de la enfermedad en cuestión. Generalmente, el grado de mejora lo determina un médico, que puede realizar esta determinación en función de signos, síntomas, biopsias u otros resultados de pruebas y puede además emplear cuestionarios dirigidos al sujeto, tales como cuestionarios sobre calidad de vida desarrollados para una enfermedad determinada. Por ejemplo, un antígeno del SARS-CoV-2 (por ejemplo, un antígeno espicular del SARS-CoV-2 administrado como pGX9501 o INO-4800 o un biosimilar de este) se puede administrar para lograr una mejora en la afección de un paciente relacionada con una infección por SARS-CoV-2. La mejora se puede indicar mediante una mejora en un índice de actividad de enfermedad, mediante el alivio de síntomas clínicos o mediante cualquier otra medida de actividad de la enfermedad.

[0093] Como se usa en la presente, “variante” con respecto a un ácido nucleico significa (i) una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos indicada; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos indicada o una porción de esta; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico indicado o el complemento de este; o (iv) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico indicado, un complemento de este o una secuencia sustancialmente idéntica a este.

[0094] Variante se puede definir además como un péptido o polipéptido que difiere

en la secuencia de aminoácidos por la inserción, eliminación o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que conserva al menos una actividad biológica. Los ejemplos representativos de “actividad biológica” incluyen la capacidad de unirse mediante un anticuerpo específico o promover una respuesta inmunitaria. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína indicada con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. En la técnica se reconoce una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, el reemplazo de un aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliidad, grado y distribución de regiones con carga) que normalmente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, al considerar el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares se pueden sustituir y todavía conservar la función proteica. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliidad de los aminoácidos también se puede utilizar para revelar sustituciones que darían como resultado que las proteínas conservaran su función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofiliidad local promedio de ese péptido, una medida útil que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad similares puede dar como resultado que los péptidos retengan la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones se pueden llevar a cabo con aminoácidos que tengan valores de hidrofiliidad dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. De manera consistente con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y, en particular, de las cadenas laterales de esos aminoácidos, según lo revelado por la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la carga, el tamaño y otras propiedades.

[0095] Una variante puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que es sustancialmente idéntica a lo largo de la longitud completa de la secuencia génica completa o un fragmento de esta. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser 80 %,

81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a lo largo de la longitud completa de la secuencia genética o un fragmento de esta. Una variante puede ser una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o un fragmento de esta. La secuencia de aminoácidos puede ser 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o un fragmento de esta.

[0096] Como se usa en la presente, “vector” significa una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un vector viral, un bacteriófago, un cromosoma artificial bacteriano o un cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o de ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante y, preferentemente, es un plásmido de ADN.

[0097] Para la enumeración de rangos numéricos en la presente, se contempla explícitamente cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el rango de 6-9, los números 7 y 8 se contemplan además de 6 y 9, y para el rango 6,0-7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se contemplan explícitamente.

[0098] *Moléculas de ácido nucleico, antígenos y composiciones inmunogénicas*

[0099] En la presente se proporcionan composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno del SARS-CoV-2, un fragmento de este, una variante de este o una combinación de este. Además, en la presente se proporcionan composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, que comprenden un antígeno del SARS-CoV-2, un fragmento de este, una variante de este o una combinación de este. Las composiciones inmunogénicas se pueden usar para proteger y tratar cualquier cantidad de cepas del SARS-CoV-2, por lo que se trata, se previene y/o se protege contra enfermedades relacionadas con el SARS-CoV-2. Las composiciones inmunogénicas pueden inducir de manera significativa una respuesta inmunitaria de un sujeto al que se le administró las composiciones inmunogénicas, por lo que se protege y se trata una infección por SARS-CoV-2.

[0100] La composición inmunogénica puede ser una vacuna de ADN, una vacuna de péptido o una vacuna de combinación de ADN y de péptido. La vacuna de ADN puede incluir una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno del SARS-CoV-

2. La molécula de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, cADN, una variante de estos, un fragmento de estos o una combinación de estos. La molécula de ácido nucleico puede incluir además secuencias adicionales que codifican secuencias de etiqueta, líderes o ligadoras que están ligadas a la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno del SARS-CoV-2 mediante un enlace peptídico. La vacuna de péptido puede incluir un péptido antigénico del SARS-CoV-2, una proteína antigénica del SARS-CoV-2, una variante de estos, un fragmento de estos o una combinación de estos. La vacuna de combinación de ADN y de péptido pueden incluir la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente que codifica el antígeno del SARS-CoV-2 y la proteína o el péptido antigénico del SARS-CoV-2, en donde la proteína o el péptido antigénico del SARS-CoV-2 y el antígeno del SARS-CoV-2 codificado tienen la misma secuencia de aminoácidos.

[0101] Las composiciones inmunogénicas divulgadas pueden provocar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares que se dirigen al antígeno del SARS-CoV-2 en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica. Las composiciones inmunogénicas divulgadas pueden producir anticuerpos neutralizantes y anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) reactivos con el antígeno espicular del SARS-CoV-2. La composición inmunogénica también puede provocar respuestas de linfocitos T CD8+ y CD4+ reactivos al antígeno del SARS-CoV-2 y producir interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-2 (IL-2).

[0102] La composición inmunogénica puede inducir una respuesta inmunitaria humoral en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica. La respuesta inmunitaria humoral inducida puede ser específica contra el antígeno del SARS-CoV-2. La respuesta inmunitaria humoral inducida puede ser reactiva con el antígeno del SARS-CoV-2. La respuesta inmunitaria humoral se puede inducir en el sujeto al que se le administró la vacuna en alrededor de 1,5 veces a alrededor de 16 veces, alrededor de 2 veces a alrededor de 12 veces, o alrededor de 3 veces a alrededor de 10 veces. La respuesta inmunitaria humoral se puede inducir en el sujeto al que se le administró la vacuna en al menos alrededor de 1,5 veces, al menos alrededor de 2,0 veces, al menos alrededor de 2,5 veces, al menos alrededor de 3,0 veces, al menos alrededor de 3,5 veces, al menos alrededor de 4,0 veces, al menos alrededor de 4,5 veces, al menos alrededor de 5,0 veces, al menos alrededor de 5,5 veces, al menos alrededor de 6,0 veces, al menos alrededor de 6,5 veces, al menos alrededor de 7,0 veces, al menos alrededor de 7,5 veces, al menos alrededor de 8,0 veces, al menos alrededor de 8,5 veces, al menos alrededor de 9,0 veces, al menos

alrededor de 9,5 veces, al menos alrededor de 10,0 veces, al menos alrededor de 10,5 veces, al menos alrededor de 11,0 veces, al menos alrededor de 11,5 veces, al menos alrededor de 12,0 veces, al menos alrededor de 12,5 veces, al menos alrededor de 13,0 veces, al menos alrededor de 13,5 veces, al menos alrededor de 14,0 veces, al menos alrededor de 14,5 veces, al menos alrededor de 15,0 veces, al menos alrededor de 15,5 veces o al menos alrededor de 16,0 veces.

[0103] La respuesta inmunitaria humoral inducida por la composición inmunogénica puede incluir un mayor nivel de anticuerpos neutralizantes asociados con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica en comparación con un sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser específicos contra el antígeno del SARS-CoV-2. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser reactivos con el antígeno del SARS-CoV-2. Los anticuerpos neutralizantes pueden proporcionar protección y/o tratamiento contra una infección por SARS-CoV-2 y sus enfermedades asociadas en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica.

[0104] La respuesta inmunitaria humoral inducida por la composición inmunogénica puede incluir un mayor nivel de anticuerpos IgG asociados con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica en comparación con un sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica. Estos anticuerpos IgG pueden ser específicos contra el antígeno del SARS-CoV-2. Estos anticuerpos IgG pueden ser reactivos con el antígeno del SARS-CoV-2. El nivel del anticuerpo IgG asociado con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en alrededor de 1,5 veces a alrededor de 16 veces, alrededor de 2 veces a alrededor de 12 veces o alrededor de 3 veces a alrededor de 10 veces en comparación con un sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica. El nivel del anticuerpo IgG asociado con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 1,5 veces, al menos alrededor de 2,0 veces, al menos alrededor de 2,5 veces, al menos alrededor de 3,0 veces, al menos alrededor de 3,5 veces, al menos alrededor de 4,0 veces, al menos alrededor de 4,5 veces, al menos alrededor de 5,0 veces, al menos alrededor de 5,5 veces, al menos alrededor de 6,0 veces, al menos alrededor de 6,5 veces, al menos alrededor de 7,0 veces, al menos alrededor de 7,5 veces, al menos alrededor de 8,0 veces, al menos alrededor de 8,5 veces, al menos alrededor de 9,0 veces, al menos alrededor de 9,5 veces, al menos alrededor de 10,0 veces, al menos alrededor de 10,5 veces, al menos alrededor de 11,0 veces, al menos alrededor de 11,5 veces, al menos alrededor de

12,0 veces, al menos alrededor de 12,5 veces, al menos alrededor de 13,0 veces, al menos alrededor de 13,5 veces, al menos alrededor de 14,0 veces, al menos alrededor de 14,5 veces, al menos alrededor de 15,0 veces, al menos alrededor de 15,5 veces o al menos alrededor de 16,0 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0105] La composición inmunogénica puede inducir una respuesta inmunitaria celular en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica. La respuesta inmunitaria celular inducida puede ser específica contra el antígeno del SARS-CoV-2. La respuesta inmunitaria celular inducida puede ser reactiva con el antígeno del SARS-CoV-2. La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir provocar una repuesta de linfocitos T CD8+. La repuesta de linfocitos T CD8+ provocada puede ser reactiva con el antígeno del SARS-CoV-2. La repuesta de linfocitos T CD8+ provocada puede ser polifuncional. La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir provocar una repuesta de linfocitos T CD8+, en donde los linfocitos T CD8+ producen interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) o una combinación de IFN- γ y TNF- α .

[0106] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor respuesta de linfocitos T CD8+ asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica. La respuesta de linfocitos T CD8+ asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en alrededor de 2 veces a alrededor de 30 veces, alrededor de 3 veces a alrededor de 25 veces o alrededor de 4 veces a alrededor de 20 veces en comparación con un sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica. La respuesta de linfocitos T CD8+ asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 1,5 veces, al menos alrededor de 2,0 veces, al menos alrededor de 3,0 veces, al menos alrededor de 4,0 veces, al menos alrededor de 5,0 veces, al menos alrededor de 6,0 veces, al menos alrededor de 6,5 veces, al menos alrededor de 7,0 veces, al menos alrededor de 7,5 veces, al menos alrededor de 8,0 veces, al menos alrededor de 8,5 veces, al menos alrededor de 9,0 veces, al menos alrededor de 9,5 veces, al menos alrededor de 10,0 veces, al menos alrededor de 10,5 veces, al menos alrededor de 11,0 veces, al menos alrededor de 11,5 veces, al menos alrededor de 12,0 veces, al menos alrededor de 12,5 veces, al menos alrededor de 13,0 veces, al menos alrededor de 13,5 veces, al menos alrededor de 14,0 veces, al menos alrededor de 14,5 veces, al menos alrededor de 15,0 veces, al menos

alrededor de 16,0 veces, al menos alrededor de 17,0 veces, al menos alrededor de 18,0 veces, al menos alrededor de 19,0 veces, al menos alrededor de 20,0 veces, al menos alrededor de 21,0 veces, al menos alrededor de 22,0 veces, al menos alrededor de 23,0 veces, al menos alrededor de 24,0 veces, al menos alrededor de 25,0 veces, al menos alrededor de 26,0 veces, al menos alrededor de 27,0 veces, al menos alrededor de 28,0 veces, al menos alrededor de 29,0 veces o al menos alrededor de 30,0 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0107] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+ que producen IFN- γ . La frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+IFN- γ + asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces o 20 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0108] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+ que producen TNF- α . La frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+TNF- α + asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces o 14 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0109] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+ que producen IL-2. La frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+IL-2+ asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 0,5 veces, 1,0 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces o 5,0 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0110] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+ que producen tanto IFN- γ como TNF- α . La frecuencia de linfocitos T CD3+CD8+IFN- γ +TNF- α + asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 55 veces, 60 veces, 65 veces, 70 veces, 75 veces, 80 veces, 85 veces, 90 veces, 95 veces, 100 veces, 110 veces, 120 veces, 130 veces, 140 veces, 150 veces, 160 veces, 170 veces o 180 veces en

comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0111] La respuesta inmunitaria celular inducida por la composición inmunogénica puede incluir provocar una respuesta de linfocitos T CD4+. La repuesta de linfocitos T CD4+ provocada puede ser reactiva con el antígeno del SARS-CoV-2. La repuesta de linfocitos T CD4+ provocada puede ser polifuncional. La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir provocar una repuesta de linfocitos T CD4+, en donde los linfocitos T CD4+ producen IFN- γ , TNF- α , IL-2 o una combinación de IFN- γ y TNF- α .

[0112] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+ que producen IFN- γ . La frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+IFN- γ + asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces o 20 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0113] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+ que producen TNF- α . La frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+TNF- α + asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 21 veces o 22 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0114] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+ que producen IL-2. La frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+IL-2+ asociada con el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 21 veces, 22 veces, 23 veces, 24 veces, 25 veces, 26 veces, 27 veces, 28 veces, 29 veces, 30 veces, 31 veces, 32 veces, 33 veces, 34 veces, 35 veces, 36 veces, 37 veces, 38 veces, 39 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 55 veces o 60 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0115] La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una mayor frecuencia de linfocitos T CD3+CD4+ que producen tanto IFN- γ como TNF- α . La frecuencia de CD3+CD4+IFN- γ +TNF- α + asociada con el sujeto al que se le administró la

composición inmunogénica se puede aumentar en al menos alrededor de 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 5,5 veces, 6,0 veces, 6,5 veces, 7,0 veces, 7,5 veces, 8,0 veces, 8,5 veces, 9,0 veces, 9,5 veces, 10,0 veces, 10,5 veces, 11,0 veces, 11,5 veces, 12,0 veces, 12,5 veces, 13,0 veces, 13,5 veces, 14,0 veces, 14,5 veces, 15,0 veces, 15,5 veces, 16,0 veces, 16,5 veces, 17,0 veces, 17,5 veces, 18,0 veces, 18,5 veces, 19,0 veces, 19,5 veces, 20,0 veces, 21 veces, 22 veces, 23 veces, 24 veces, 25 veces, 26 veces, 27 veces, 28 veces, 29 veces, 30 veces, 31 veces, 32 veces, 33 veces, 34 veces o 35 veces en comparación con el sujeto al que no se le administró la composición inmunogénica.

[0116] La composición inmunogénica de la presente invención puede tener las características que requieren las composiciones inmunogénicas eficaces, tal como la seguridad, de manera que la propia composición inmunogénica no genere enfermedad ni deceso; la protección contra la enfermedad que surge de la exposición a patógenos vivos, tales como virus o bacterias; la inducción de anticuerpos neutralizantes para evitar la invasión de células; la inducción de linfocitos T protectores contra patógenos intracelulares; y la facilidad de administración, pocos efectos secundarios, estabilidad biológica y bajo costo por dosis.

[0117] La composición inmunogénica puede además inducir una respuesta inmunitaria al administrarla en diferentes tejidos, tal como el músculo o la piel. La composición inmunogénica puede además inducir una respuesta inmunitaria al administrarla por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, opcionalmente seguida de electroporación como se describe en la presente.

[0118] a. Antígeno del SARS-CoV-2 y moléculas de ácido nucleico que lo codifican

[0119] Como se describió anteriormente, en la presente se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno del SARS-CoV-2, un fragmento de este, una variante de este o una combinación de este. Además, en la presente se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno del SARS-CoV-2, un fragmento de este, una variante de este o una combinación de este.

[0120] Tras la unión a proteínas de la superficie celular y fusión en la membrana, el coronavirus ingresa a la célula y se libera su genoma de ARN monocatenario en el citoplasma de la célula infectada. El genoma de ARN monocatenario es una cadena positiva y, por lo tanto, se puede traducir a polimerasa de ARN, que produce ARN virales adicionales que son cadenas negativas. En consecuencia, el antígeno del

SARS-CoV-2 también puede ser una polimerasa de ARN del SARS-CoV-2.

[0121] Las cadenas de ARN viral negativas se transcriben en cadenas de ARN positivas subgenómicas más pequeñas, que se usan para traducir otras proteínas virales, por ejemplo, proteína de la nucleocápside (N), proteína de envoltura (E) y proteína de la matriz (M). En consecuencia, el antígeno del SARS-CoV-2 puede comprender una proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2, una proteína de envoltura del SARS-CoV-2 o una proteína de la matriz del SARS-CoV-2.

[0122] Las cadenas de ARN viral negativas también se pueden usar para replicar el genoma viral, que está unido mediante la proteína de la nucleocápside. La proteína de la matriz, junto con la proteína espicular, se integra al retículo endoplasmático de la célula infectada. En conjunto, la proteína de la nucleocápside unida al genoma viral y las proteínas espiculares y de la matriz integradas en la membrana producen su gemación en el lumen del retículo endoplasmático, por lo que encapsulan el genoma viral en una membrana. La progenie viral luego se transporta mediante las vesículas del aparato de Golgi hacia la membrana celular de la célula infectada y se libera en el espacio extracelular por endocitosis.

[0123] Los coronavirus, incluso el SARS-CoV-2, son encapsulados por una membrana y tienen una glucoproteína de membrana de tipo 1 conocida como proteína espicular (S), que forma espículas que sobresalen en la superficie del coronavirus. La proteína S del SARS-CoV-2 es una proteína de fusión de membrana de clase I, que es la proteína de envoltura principal en la superficie de los coronavirus. La proteína espicular facilita la unión del coronavirus a proteínas que se ubican en la superficie de una célula, por ejemplo, la metaloproteasa aminopeptidasa N, e interviene en la fusión de la membrana celular-viral. En particular, la proteína espicular contiene una subunidad S1 que facilita la unión del coronavirus a las proteínas de la superficie celular. En consecuencia, la subunidad S1 de la proteína espicular controla las células que fueron infectadas por el coronavirus. La proteína espicular también contiene una subunidad S2, que es una subunidad de transmembrana que facilita la fusión de la membrana celular y viral. En consecuencia, el antígeno del SARS-CoV-2 puede comprender una proteína espicular del SARS-CoV-2, una subunidad S1 de una proteína espicular del SARS-CoV-2, una subunidad S2 de una proteína espicular del SARS-CoV-2 o un fragmento de la subunidad S1 que comprende el dominio de unión al receptor espicular del SARS-CoV-2.

[0124] En algunas formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 puede ser una proteína espicular del SARS-CoV-2, una polimerasa de ARN del SARS-CoV-2,

una proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2, una proteína de envoltura del SARS-CoV-2, una proteína de la matriz del SARS-CoV-2, un fragmento de estas, una variante de estas o una combinación de estas.

[0125] El antígeno del SARS-CoV-2 puede ser un antígeno espicular del SARS-CoV-2, un fragmento de este, una variante de este o una combinación de este. El antígeno espicular del SARS-CoV-2 puede provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero contra una o más cepas del SARS-CoV-2. El antígeno espicular del SARS-CoV-2 puede comprender epítomos que lo hacen particularmente eficaz como un inmunógeno contra el cual se puede inducir una respuesta inmunitaria anti-SARS-CoV-2.

[0126] El antígeno del SARS-CoV-2 puede ser un antígeno de consenso derivado de dos o más cepas del SARS-CoV-2. En algunas formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 es un antígeno espicular de consenso del SARS-CoV-2. El antígeno espicular de consenso del SARS-CoV-2 puede derivar de secuencias de antígenos espiculares de cepas del SARS-CoV-2 y, por lo tanto, el antígeno espicular de consenso del SARS-CoV-2 es único. En algunas formas de realización, el antígeno espicular de consenso del SARS-CoV-2 puede ser un antígeno espicular atípico, que tiene una divergencia de secuencia de aminoácidos mayor que otras proteínas espiculares del SARS-CoV-2. En consecuencia, las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden aplicar ampliamente a múltiples cepas del SARS-CoV-2, debido a las secuencias únicas del antígeno espicular de consenso del SARS-CoV-2. Estas secuencias únicas permiten que la vacuna proteja de manera universal contra múltiples cepas del SARS-CoV-2, incluso variantes genéticamente diversas del SARS-CoV-2. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el antígeno del SARS-CoV-2 se pueden modificar para una mejor expresión. La modificación puede incluir optimización de codones, optimización de ARN, adición de una secuencia de Kozak para aumentar el inicio de la traducción y/o adición de una secuencia líder de inmunoglobulina para aumentar la inmunogenicidad del antígeno del SARS-CoV-2. El antígeno espicular del SARS-CoV-2 puede comprender un péptido de señal, tal como un péptido de señal de inmunoglobulina, por ejemplo, entre otros, un péptido de señal de inmunoglobulina E (IgE) o inmunoglobulina (IgG). En algunas formas de realización, el antígeno espicular del SARS-CoV-2 puede comprender una etiqueta de hemaglutinina (HA). El antígeno espicular del SARS-CoV-2 puede diseñarse para provocar respuestas inmunitarias celulares y/o humorales más potentes y amplias que un antígeno espicular de codones optimizados correspondiente.

87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 6; o la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.

[0129] En algunas formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 está ligado operativamente a una secuencia líder de IgE. En algunas de tales formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 está codificado por la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización en donde el antígeno del SARS-CoV-2 incluye una líder de IgE, el antígeno del SARS-CoV-2 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4. En algunas de tales formas de realización, el antígeno del SARS-CoV-2 está codificado por la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

[0130] Se pueden proporcionar fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos no tienen una secuencia líder.

[0131] Se pueden proporcionar fragmentos inmunogénicos de proteínas con secuencias de aminoácidos homólogas a los fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 1. Tales fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de las proteínas que son 95 % homólogas a SEQ ID NO: 1. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 96 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 97 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 98 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 99 % de homología con los

fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos no tienen una secuencia líder.

[0132] Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos inmunogénicos pueden ser al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de SEQ ID NO: 1. Los fragmentos inmunogénicos pueden ser al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % homólogos a los fragmentos de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen secuencias que codifican una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos no tienen secuencias codificantes que codifican una secuencia líder.

[0133] Se pueden proporcionar fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 4. Los fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos no tienen una secuencia líder.

[0134] Se pueden proporcionar fragmentos inmunogénicos de proteínas con secuencias de aminoácidos homólogas a los fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 4. Dichos fragmentos inmunogénicos pueden comprender al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de las proteínas que son 95 % homólogas a la SEQ ID NO: 4. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 96 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 97 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 98 % de homología con los

fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos que tienen 99 % de homología con los fragmentos inmunogénicos de secuencias de proteínas de consenso en la presente. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos no tienen una secuencia líder.

[0135] Algunas formas de realización se refieren a fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 4. Los fragmentos inmunogénicos pueden ser al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de SEQ ID NO: 4. Los fragmentos inmunogénicos pueden ser al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % homólogos a los fragmentos de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, los fragmentos inmunogénicos incluyen secuencias que codifican una secuencia líder, tal como, por ejemplo, una líder de inmunoglobulina, tal como la líder de IgE. En algunas formas de realización, los fragmentos no tienen secuencias codificantes que codifican una secuencia líder.

[0136] b. Vector

[0137] Las composiciones inmunogénicas pueden comprender uno o más vectores que incluyen una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno del SARS-CoV-2. El uno o más vectores pueden ser capaces de expresar el antígeno. El vector puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un origen de replicación. El vector puede ser un plásmido, un bacteriófago, un cromosoma artificial bacteriano o un cromosoma artificial de levadura. El vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante o un vector que se integra en un genoma huésped.

[0138] El uno o más vectores pueden ser un constructo de expresión, que es generalmente un plásmido que se usa para introducir un gen específico en una célula diana. Una vez que el vector de expresión se encuentra dentro de la célula, se produce la proteína codificada por el gen mediante complejos ribosómicos de maquinaria de transcripción y traducción celulares. El plásmido frecuentemente es diseñado por ingeniería genética para contener secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y promotoras y conducen a una transcripción eficaz del gen portado en el vector de expresión. Los vectores de la presente invención expresan grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por lo tanto, proteínas. **[0139]** Los vectores pueden tener señales de expresión, tales como un promotor potente, un

codón de terminación potente, ajuste de la distancia entre el promotor y el gen clonado y la inserción de una secuencia de terminación de la transcripción y PTIS (secuencia de inicio de la traducción portátil).

[0140] (1) Vectores de expresión

[0141] El vector puede ser un plásmido circular o un ácido nucleico lineal. El plásmido circular y el ácido nucleico lineal son capaces de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula adecuada del sujeto. El vector puede tener un promotor ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica al antígeno, que puede estar ligada operativamente a las señales de terminación. El vector también puede contener secuencias requeridas para la correcta traducción de la secuencia de nucleótidos. El vector que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar controlado por un promotor constitutivo o un promotor inducible, que inicia la transcripción solo cuando la célula huésped está expuesta a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico de un tejido u órgano o etapa de desarrollo particulares.

[0142] (2) Vectores circulares y lineales

[0143] El vector puede ser un plásmido circular, que puede transformar una célula diana mediante integración en el genoma celular o existir extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido de replicación autónomo con un origen de replicación).

[0144] El vector puede ser pVAX, pcDNA3.0, pGX-0001 o provax o cualquier otro vector de expresión que pueda expresar ADN que codifique el antígeno y le permita a una célula la traducción de la secuencia a un antígeno reconocido por el sistema inmunitario.

[0145] En la presente también se proporciona una composición inmunogénica de ácido nucleico lineal o casete de expresión lineal ("LEC") que puede administrarse de forma eficaz a un sujeto mediante electroporación y expresión de uno o más antígenos deseados. El LEC puede ser cualquier ADN lineal carente de cualquier cadena principal de fosfato. El ADN puede codificar uno o más antígenos. El LEC puede contener un promotor, un intrón, un codón de detención y/o una señal de poliadenilación. La expresión del antígeno se puede controlar con el promotor. El LEC puede no contener ningún gen de resistencia a antibióticos y/o ninguna cadena principal de fosfato. El LEC puede no contener otras secuencias de ácido nucleico no

relacionadas con la expresión génica de antígeno deseada.

[0146] El LEC se puede derivar de cualquier plásmido que se pueda linearizar. El plásmido puede ser capaz de expresar el antígeno. El plásmido puede ser el pNP (Puerto Rico/34) o pM2 (Nueva Caledonia/99). El plásmido puede ser WLV009, pVAX, pcDNA3.0 o provax o cualquier otro vector de expresión que pueda expresar ADN que codifique el antígeno y le permita a una célula la traducción de la secuencia a un antígeno reconocido por el sistema inmunitario.

[0147] El LEC puede ser perM2. El LEC puede ser perNP. perNP y perMR se pueden derivar de pNP (Puerto Rico/34) y pM2 (New Caledonia/99), respectivamente.

[0148] (3) Promotor, intrón, codón de detención y señal de poliadenilación

[0149] El vector puede tener un promotor. Un promotor puede ser cualquier promotor que pueda impulsar la expresión génica y regular la expresión del ácido nucleico aislado. Tal promotor es un elemento de secuencia en cis requerido para la transcripción mediante una polimerasa de ARN dependiente de ADN, que transcribe la secuencia del antígeno descrita en la presente. La selección del promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor puede estar posicionado alrededor de la misma distancia del inicio de la transcripción en el vector de la misma manera en que lo está del sitio de inicio de la transcripción en su configuración natural. Sin embargo, pueden existir variaciones en esta distancia sin pérdida de la función promotora.

[0150] El promotor puede unirse operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno y señales necesarias para la poliadenilación eficaz de la transcripción, sitios de unión a ribosoma y terminación de la traducción. El promotor puede ser un promotor de CMV, promotor de SV40 temprano, promotor de SV40 tardío, promotor de metalotioneína, promotor del virus murino de tumor mamario, promotor del virus de sarcoma de Rous, promotor de polihedrina u otro promotor eficaz para la expresión en células eucariotas.

[0151] El vector puede incluir un potenciador y un intrón con sitios funcionales donantes y aceptores de corte y empalme. El vector puede contener una región de terminación de la transcripción secuencia abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de terminación se puede obtener a partir del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener a partir de genes distintos.

[0152] c. Excipientes y otros componentes de las composiciones inmunogénicas

[0153] Las composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. El excipiente aceptable

desde el punto de vista farmacéutico pueden ser moléculas funcionales, tales como vehículos, portadores, amortiguadores o diluyentes. Como se usa en la presente, “amortiguador” se refiere a una solución amortiguada que resiste a los cambios de pH por la acción de sus componentes del conjugado ácido-base. El amortiguador generalmente tiene un pH de alrededor de 4,0 a alrededor de 8,0, por ejemplo, de alrededor de 5,0 a alrededor de 7,0. En algunas formas de realización, el amortiguador es amortiguador de solución salina-citrato de sodio (SSC). En algunas formas de realización en las que la composición inmunogénica comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno espicular de SARS-CoV-2 como se describió anteriormente, la composición inmunogénica comprende 10 mg/ml de vector en amortiguador, por ejemplo, entre otros, amortiguador de SSC. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica comprende 10 mg/ml del plásmido de ADN pGX9501 o pGX9503 en amortiguador. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica se almacena a alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica se almacena a temperatura ambiente. La composición inmunogénica puede almacenarse durante al menos un año a temperatura ambiente. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica es estable a temperatura ambiente durante al menos un año, en donde la estabilidad se define como un porcentaje de plásmido superenrollado de al menos alrededor de 80 %. En algunas formas de realización, el porcentaje de plásmido superenrollado es de al menos alrededor de 85 % después del almacenamiento durante al menos un año a temperatura ambiente.

[0154] El excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico puede ser un agente que facilita la transfección, que puede incluir agentes tensioactivos, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS que incluye lípido de monofosforilo A, péptidos de muramilo, análogos de quinona, vesículas tales como escualeno y escualeno, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes o nanopartículas u otros agentes conocidos que facilitan la transfección.

[0155] El agente que facilita la transfección puede ser un polianión, un polication, que incluye poli-L-glutamato (LGS) o lípido. El agente que facilita la transfección es poli-L-glutamato y el poli-L-glutamato puede estar presente en la composición inmunogénica a una concentración menor de 6 mg/ml. El agente que facilita la transfección también puede incluir agentes tensioactivos, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS que

incluye monofosforil lípido A, péptidos muramilo, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualeno, y también se puede usar ácido hialurónico administrado junto con el constructo genético. Las composiciones inmunogénicas de plásmido de ADN también pueden incluir un agente que facilita la transfección, tal como lípidos, liposomas, incluidos liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposomas (ver, por ejemplo, WO9324640), iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes o nanopartículas u otros agentes conocidos que facilitan la transfección. El agente que facilita la transfección es un polianión, un polication, que incluye poli-L-glutamato (LGS) o lípido. La concentración del agente de transfección en la composición inmunogénica puede ser menor de 4 mg/ml, menor de 2 mg/ml, menor de 1 mg/ml, menor de 0,750 mg/ml, menor de 0,500 mg/ml, menor de 0,250 mg/ml, menor de 0,100 mg/ml, menor de 0,050 mg/ml o menor de 0,010 mg/ml.

[0156] El excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico puede ser un adyuvante. El adyuvante pueden ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o se administran como proteínas en combinación con el plásmido anterior en la composición inmunogénica. El adyuvante se puede seleccionar del grupo que consiste en: α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), γ -interferón, promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimiocina que atrae linfocitos T cutáneos (CTACK), quimiocina expresada en timo epitelial (TECK), quimiocina epitelial asociada a mucosas (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86 que incluye IL-15 que tiene la secuencia de señal eliminada e incluye opcionalmente el péptido de señal de IgE. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 o una combinación de estos.

[0157] Otros genes que pueden ser útiles como adyuvantes incluyen aquellos que codifican: MCP-1, MIP- 1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM- 1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150,95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, IL-22, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK,

genes de respuesta al interferón, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de estos.

[0158] La composición inmunogénica puede comprender además un agente que facilita la vacuna genética como se describe en la patente estadounidense N.º de serie 021.579 presentada el 1 de abril de 1994, que se incorpora en su totalidad por referencia.

[0159] La composición inmunogénica se puede formular de acuerdo con el modo de administración que se usará. De acuerdo con algunas formas de realización, la composición inmunogénica se formula en un amortiguador, opcionalmente amortiguador de solución salina-citrato de sodio. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede formularse a una concentración de 10 mg de molécula de ácido nucleico por mililitro de un amortiguador de citrato de sal de sodio. Una composición farmacéutica inmunogénica inyectable puede ser estéril, libre de pirógenos y libre de partículas. Se puede usar una solución o formulación isotónica. Los aditivos de isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. La composición inmunogénica puede comprender un agente de vasoconstricción. Las soluciones isotónicas pueden incluir solución salina amortiguada con fosfato. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además estabilizantes que incluyen gelatina y albúmina. Los estabilizantes permiten que la formulación esté estable a temperatura ambiente durante extensos períodos de tiempo, incluidos LGS o polianiones.

[0160] También se proporcionan en la presente artículos de elaboración que comprenden la composición inmunogénica. En algunas formas de realización, el artículo de elaboración es un recipiente que tiene la composición inmunogénica. El recipiente puede ser, por ejemplo, entre otros, una jeringa o un vial. El vial puede tener un tapón que se pueda perforar por una jeringa.

[0161] La composición inmunogénica se puede envasar en recipientes esterilizados de manera adecuada, tal como ampollas, botellas o viales, ya sea en formas de dosis múltiple o dosis unitaria. Los recipientes preferentemente se sellan herméticamente después de ser llenados con una preparación de vacuna. Preferentemente, las vacunas se envasan en un recipiente con una etiqueta fijada, la cual identifica la vacuna y lleva un rótulo en una forma prescrita por una agencia gubernamental, tal como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, que

refleje la aprobación de la vacuna según las leyes adecuadas, información de dosis y similares. La etiqueta preferentemente contiene información sobre la vacuna útil para un profesional de la salud que administra la vacuna a un paciente. El envase también contiene preferentemente materiales informativos impresos con referencia a la administración de la vacuna, instrucciones, indicaciones y cualquier advertencia necesaria.

[0162] Métodos de vacunación

[0163] También se proporcionan en la presente métodos para tratar, proteger y/o evitar una enfermedad en un sujeto que lo necesite al administrar la composición inmunogénica al sujeto. La administración de la composición inmunogénica al sujeto puede inducir o provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto. La respuesta inmunitaria inducida se puede usar para tratar, prevenir y/o proteger de una enfermedad, por ejemplo, patologías que se relacionen con la infección por SARS-CoV-2. La respuesta inmunitaria inducida en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica puede proporcionar resistencia ante una o más cepas de SARS-CoV-2.

[0164] La respuesta inmunitaria inducida puede incluir una respuesta inmunitaria humoral inducida y/o una respuesta inmunitaria celular inducida. La respuesta inmunitaria humoral se puede inducir en alrededor de 1,5 veces a alrededor de 16 veces, alrededor de 2 veces a alrededor de 12 veces o alrededor de 3 veces a alrededor de 10 veces. La respuesta inmunitaria humoral inducida puede incluir anticuerpos IgG y/o anticuerpos neutralizantes que son reactivos al antígeno. La respuesta inmunitaria celular inducida puede incluir una respuesta de linfocitos T CD8+, que se induce en alrededor de 2 veces a alrededor de 30 veces, alrededor de 3 veces a alrededor de 25 veces o alrededor de 4 veces a alrededor de 20 veces.

[0165] La dosis de la vacuna puede ser de entre 1 µg a 10 mg de componente activo/kg peso corporal/tiempo y puede ser de 20 µg a 10 mg componente/kg peso corporal/tiempo. La vacuna se puede administrar cada 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más días, o cada 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más semanas. La cantidad de dosis de vacuna para un tratamiento eficaz puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

[0166] En una forma de realización, la dosis total de la vacuna es de 1,0 mg de ácido nucleico. En una forma de realización, la dosis total de la vacuna es de 2,0 mg de ácido nucleico, administrado como 2 x 1,0 mg de ácido nucleico.

[0167] a. Administración

[0168] La composición inmunogénica se puede formular de acuerdo con técnicas estándar bien conocidas para las personas del oficio farmacéutico de nivel medio. Tales composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas para las personas del oficio médico de nivel medio, teniendo en consideración tales factores como la edad, sexo, peso y afección del sujeto particular, y la vía de administración. La vacuna se puede administrar, por ejemplo, en una, dos, tres, cuatro o más inyecciones. En algunas formas de realización, se administra al sujeto una dosis inicial de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico. La dosis inicial se puede administrar en una, dos, tres o más inyecciones. La dosis inicial puede estar seguida de la administración de una, dos, tres, cuatro o más dosis posteriores de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de la molécula de ácido nucleico, alrededor de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, diez, doce o más semanas después de la dosis inmediatamente anterior. Cada dosis posterior se puede administrar en una, dos, tres o más inyecciones. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica se administra al sujeto antes del agente adicional, con este o después de este. En algunas formas de realización, la composición inmunogénica se administra como un refuerzo después de la administración de un agente para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención o de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2. En una forma de realización, la enfermedad o el trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 incluye, entre otros, enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19). En algunas formas de realización, la enfermedad o el trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 es síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C).

[0169] Los sujetos pueden ser un mamífero, tal como un ser humano, un caballo, un primate no humano, una vaca, un cerdo, una oveja, un gato, un perro, un cobayo, un conejo, una rata o un ratón.

[0170] La vacuna se puede administrar de forma profiláctica o terapéutica. En la administración profiláctica, las vacunas se pueden administrar en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. En las aplicaciones terapéuticas, las vacunas se administran a un sujeto que lo necesite en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Una cantidad adecuada para lograr eso se define como “dosis terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, de la composición particular del esquema de vacunación administrado, la

forma de administración, la etapa y gravedad de la enfermedad, el estado general de salud del paciente y el criterio del médico tratante.

[0171] La vacuna se puede administrar mediante métodos bien conocidos en la técnica como se describió en Donnelly *et al.* (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner *et al.* (Patente estadounidense N.º 5,580,859, emitida el 3 de diciembre de 1996); Felgner (Patente estadounidense N.º 5.703.055, emitida el 30 de diciembre de 1997); y Carson *et al.* (Patente estadounidense N.º 5.679.647, emitida el 21 de octubre de 1997), cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. El ADN de la vacuna puede formar complejos con partículas o microesferas que se pueden administrar a un individuo, por ejemplo, con el uso de una pistola para vacunación. Una persona del oficio de nivel medio sabrá que la elección de un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, incluso un compuesto aceptable desde el punto de vista fisiológico, depende, por ejemplo, de la vía de administración del vector de expresión.

[0172] La vacuna puede administrarse mediante una variedad de vías. Las vías de administración típicas incluyen administración parenteral, por ejemplo, administración intradérmica, intramuscular o subcutánea. Otras vías de administración incluyen administración oral, por vía intranasal y vía intravaginal. Para el ADN de la vacuna en particular, la vacuna se puede administrar a los espacios intestinales de tejidos de un individuo (Felgner *et al.*, patente estadounidense N.º 5.580.859 y 5.703.055, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). La vacuna también se puede administrar en músculo, o se puede administrar mediante inyecciones intradérmicas o subcutáneas, o transdérmica, tal como mediante iontoforesis. La administración epidérmica de la vacuna también se puede utilizar. La administración epidérmica puede implicar irritación mecánica o química de la capa más externa de la epidermis para estimular una respuesta inmunitaria al irritante (Carson *et al.*, patente estadounidense N.º 5,679,647, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). La administración parenteral puede estar seguida opcionalmente por electroporación como se describió en la presente.

[0173] La vacuna también se puede formular para administración mediante las fosas nasales. Las formulaciones adecuadas para administración nasal, en donde el portador es un sólido, pueden incluir un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el rango de alrededor de 10 a alrededor de 500 micrómetros, que se administra de la forma en que se consume tabaco en polvo, es decir, mediante inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo cerca de la

nariz. La formulación puede ser un pulverizador nasal, gotas nasales, o mediante administración en aerosol mediante nebulizador. La formulación puede incluir soluciones acuosas u oleosas de la vacuna.

[0174] La vacuna puede ser una preparación líquida tal como una suspensión, jarabe o elixir. La vacuna también puede ser una preparación para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tal como una suspensión o emulsión estéril.

[0175] La vacuna se puede incorporar en liposomas, microesferas u otras matrices poliméricas (Felgner *et al.*, patente estadounidense N.º 5.703.055; Gregoriadis, *Liposome Technology*, Vol. I a III (2.^a ed. 1993), cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). Los liposomas pueden consistir en fosfolípidos u otros lípidos, y pueden ser portadores no tóxicos, aceptables desde el punto de vista fisiológico y metabolizables que son relativamente simples de elaborar y administrar.

[0176] La vacuna se puede administrar mediante electroporación, tal como mediante un método descrito en la patente estadounidense N.º 7.664.545, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia. La electroporación puede ser mediante un método y/o aparato descrito en las patentes estadounidenses N.º 6.302.874; 5.676.646; 6.241.701; 6.233.482; 6.216.034; 6.208.893; 6.192.270; 6.181.964; 6.150.148; 6.120.493; 6.096.020; 6.068.650; y 5.702.359, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. La electroporación puede llevarse a cabo mediante un dispositivo mínimamente invasivo.

[0177] El dispositivo de electroporación mínimamente invasivo ("MID") puede ser un aparato para inyectar la vacuna descrita anteriormente y el fluido asociado en tejido corporal. El dispositivo puede comprender una aguja hueca, casete de ADN y medios de administración de fluidos, en donde el dispositivo se adapta para activar el medio de administración de fluidos en uso para inyectar de forma concurrente (por ejemplo, automáticamente) ADN en tejido corporal durante la inserción de la aguja en dicho tejido corporal. Esto tiene la ventaja de que la capacidad de inyectar el ADN y el fluido asociado gradualmente mientras la aguja se inserta conduce a una distribución más uniforme del fluido a través del tejido corporal. El dolor experimentado durante la inyección se puede reducir a causa de que la distribución del ADN se inyecta sobre un área más grande.

[0178] El MID puede inyectar la vacuna en tejido sin el uso de una aguja. El MID puede inyectar la vacuna como un flujo o un chorro pequeños con tal fuerza que la

vacuna perfora la superficie del tejido e ingresa en el tejido y/o músculo subyacente. La fuerza detrás del flujo o chorro pequeño puede estar proporcionada por la expansión de un gas comprimido, tal como dióxido de carbono a través de un micro orificio dentro de una fracción de un segundo. Los ejemplos de dispositivos de electroporación mínimamente invasivos y métodos que los usan se describen en la solicitud de patente estadounidense publicada N.º 20080234655; patentes estadounidenses N.º 6.520.950; 7.171.264; 6.208.893; 6.009.347; 6.120.493; 7.245.963; 7.328.064; y 6.763.264, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia.

[0179] El MID puede comprender un inyector que crea un chorro a alta velocidad de líquido que perfora sin dolor el tejido. Tales inyectores sin agujas están disponibles en el comercio. Los ejemplos de inyectores sin aguja que se pueden utilizar en la presente incluyen aquellos descritos en las patentes estadounidenses N.º 3.805.783; 4.447.223; 5.505.697; y 4.342.310, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia.

[0180] Una vacuna deseada en una forma adecuada para electrotransporte directo o indirecto se puede introducir (por ejemplo, inyectar) con el uso de un inyector sin aguja en el tejido que se tratará, generalmente al poner en contacto la superficie del tejido con el inyector de forma que active la administración de un chorro del agente, con la fuerza suficiente para penetrar la vacuna en el tejido. Por ejemplo, si el tejido que se tratará es mucosa, piel o músculo, el agente se proyecta hacia la superficie de mucosa o piel con la fuerza suficiente para que el agente penetre a través del estrato córneo dentro de las capas dérmicas o en el tejido y músculo subyacente, respectivamente.

[0181] Los inyectores sin aguja son adecuados para administrar vacunas en todos los tipos de tejidos, en particular, piel y mucosas. En algunas formas de realización, puede usarse un inyector sin aguja para impulsar un líquido que contiene la vacuna hacia la superficie y dentro de la piel o mucosa del sujeto. Los ejemplos representativos de los diversos tipos de tejidos que se pueden tratar con los métodos de la invención incluyen páncreas, laringe, nasofaringe, hipofaringe, orofaringe, labio, cuello, pulmón, corazón, riñón, músculo, pecho, colon, próstata, timo, testículo, piel, tejido mucoso, ovario, vasos sanguíneos o cualquier combinación de estos.

[0182] El MID puede tener electrodos de aguja que electroporan el tejido. Al pulsar entre múltiples pares de electrodos en una matriz de electrodos múltiples, por ejemplo, configurar en patrones rectangulares o cuadrados proporciona resultados mejorados

en comparación con pulsar entre un par de electrodos. Se divulga, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 5.702.359 titulada “Electrodos de aguja para administración mediada de fármacos y genes”, una matriz de agujas en donde una pluralidad de pares de agujas pueden pulsarse durante el tratamiento terapéutico. En esa aplicación, que se incorpora en la presente por referencia como completamente establecida, las agujas se colocaron en una matriz circular, pero tenían conectores y aparatos de cambio que permitían un pulso entre pares opuestos de electrodos de aguja. Puede usarse un par de electrodos de aguja para administrar vectores de expresión recombinante a las células. Tal dispositivo y sistema se describe en la patente estadounidense N.º 6.763.264, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia. Alternativamente, puede usarse un dispositivo de una sola aguja que permite la inyección del ADN y la electroporación con una sola aguja que se parece a una aguja de inyección normal y aplica pulsos de voltaje menor al de aquellos administrados mediante los dispositivos usados actualmente, por lo que reduce la sensación eléctrica experimentada por el paciente.

[0183] El MID puede comprender una o más matrices de electrodos. Las matrices pueden comprender dos o más agujas del mismo diámetro o diámetros diferentes. Las agujas pueden estar separadas entre sí de manera uniforme o no uniforme. Las agujas pueden ser de entre 0,005 pulgadas y 0,03 pulgadas, entre 0,01 pulgadas y 0,025 pulgadas; o entre 0,015 pulgadas y 0,020 pulgadas. La aguja puede ser de 0,0175 pulgadas de diámetro. Las agujas pueden estar separadas entre sí por 0,5 mm, 1,0 mm, 1,5 mm, 2,0 mm, 2,5 mm, 3,0 mm, 3,5 mm, 4,0 mm o más.

[0184] El MID puede consistir en un generador de pulsos y dos o más inyectores de vacuna por aguja que administran la vacuna y los pulsos de electroporación en una sola etapa. El generador de pulsos puede permitir la programación flexible de parámetros de pulso e inyección mediante una computadora personal operada por tarjeta de memoria, así como un registro y almacenamiento integral de los datos de electroporación y del paciente. El generador de pulsos puede administrar una variedad de pulsos de voltaje durante cortos períodos de tiempo. Por ejemplo, el generador de pulsos puede administrar tres pulsos de 15 volts de 100 ms de duración. Un ejemplo de tal MID es el sistema Elgen 1000 de Inovio Biomedical Corporation, que se describe en la patente estadounidense N.º 7.328.064, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia.

[0185] El MID puede ser un dispositivo y sistema de CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell Pa.), que es un sistema de electrodos modular que facilita

la introducción de una macromolécula, tal como un ADN, en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El sistema de electrodos modular puede comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor de un controlador de pulsos de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de energía. Un operador puede sujetar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos con firmeza en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las macromoléculas luego se administran mediante la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador de pulsos de corriente constante programable se activa y se aplica el pulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la macromolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos. La inactivación celular por sobrecalentamiento de las células se minimiza al limitar la disipación de energía en el tejido en virtud de los pulsos de corriente constante. El dispositivo y sistema de Celectra[®] se describe en la patente estadounidense N.º 7.245.963, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia. El dispositivo de CELLECTRA[®] puede ser el dispositivo CELLECTRA 2000[®] o el dispositivo CELLECTRA[®] 3PSP.

[0186] El MID puede ser un sistema Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). El sistema Elgen 1000 puede comprender un dispositivo que proporciona una aguja hueca; y medios de administración de fluidos, en donde el aparato se adapta para activar el medio de administración de fluidos en uso para inyectar de forma concurrente (por ejemplo, automáticamente) fluido, la vacuna descrita en la presente, en tejido corporal durante la inserción de la aguja en dicho tejido corporal. La ventaja es la capacidad de inyectar el fluido gradualmente mientras la aguja se inserta, lo que conduce a una distribución más uniforme del fluido a través del tejido corporal. También se cree que el dolor experimentado durante la inyección se reduce a causa de que la distribución del volumen de fluido se inyecta sobre un área más grande.

[0187] Además, la inyección automática de fluido facilita el monitoreo y registro automático de una dosis real de fluido inyectado. Estos datos se pueden almacenar mediante una unidad de control con fines de documentación si se desea.

[0188] Se apreciará que la velocidad de inyección puede ser lineal o no lineal y que la inyección se puede realizar después de que las agujas hayan sido insertadas a través de la piel del sujeto que se tratará y mientras se insertan adicionalmente en el tejido corporal.

[0189] Los tejidos adecuados en los que el fluido puede inyectarse mediante el aparato de la presente invención incluyen tejido tumoral, piel o tejido hepático, pero puede ser tejido muscular.

[0190] El aparato comprende además medios de inserción de agujas para guiar la inserción de la aguja en el tejido corporal. La velocidad de inyección de fluido se controla mediante la velocidad de inserción de la aguja. Esto tiene la ventaja de que tanto la inserción de la aguja como la inyección de fluido se pueden controlar de forma tal que la velocidad de inserción puede coincidir con la velocidad de inyección que se desee. También permite que el aparato sea más fácil de operar para un usuario. Si se desea, se podrían proporcionar medios para insertar automáticamente la aguja en el tejido corporal.

[0191] Un usuario podría elegir cuándo comenzar la inyección de fluido. Sin embargo, idealmente la inyección comienza cuando la punta de la aguja ha llegado al tejido muscular y el aparato puede incluir medios para detectar cuándo la aguja está insertada a una profundidad suficiente para que la inyección del fluido comience. Esto significa se puede hacer que la inyección comience automáticamente cuando la aguja haya alcanzado una profundidad deseada (que normalmente será la profundidad a la que comienza el tejido muscular). La profundidad a la que comienza el tejido muscular podría tomarse, por ejemplo, para ser una profundidad de inserción de aguja predeterminada, tal como un valor de 4 mm, que sería suficiente para que la aguja pase a través de la capa de la piel.

[0192] Los medios de detección pueden comprender una sonda de ultrasonido. Los medios de detección pueden comprender un medio para detectar un cambio de impedancia o resistencia. En este caso, los medios pueden no registrar la profundidad de la aguja en el tejido corporal como tal, sino que se adaptará para detectar un cambio de impedancia o resistencia a medida que la aguja se mueve de un tipo diferente de tejido corporal hacia el músculo. Cualquiera de estas alternativas proporciona un medio relativamente exacto y simple de operar para detectar que la inyección puede comenzar. La profundidad de inserción de la aguja se puede registrar adicionalmente si se desea y podría usarse para controlar la inyección de fluido de manera que el volumen de fluido que se inyectará se determine a medida que la profundidad de inserción de la aguja se esté registrando.

[0193] El aparato puede comprender adicionalmente: una base para sostener la aguja; y una carcasa para recibir la base de esta, en donde la base se puede mover en relación con la carcasa de manera que la aguja se retracte dentro de la carcasa

cuando la base está en una primera posición hacia atrás en relación con la carcasa y la aguja se extiende hacia fuera de la carcasa cuando la base está en la segunda posición hacia delante dentro de la carcasa. Esto es ventajoso para un usuario, ya que la carcasa se puede alinear en la piel de un paciente, y las agujas luego se pueden insertar en la piel del paciente al mover la carcasa respecto de la base.

[0194] Como se explicó anteriormente, es deseable lograr una velocidad controlada de inyección de fluido para que el fluido se distribuya de manera uniforme a lo largo de la aguja a medida que se inserta en la piel. El medio de administración de fluido puede comprender medios de impulso de pistón adaptados para inyectar fluido a una velocidad controlada. El medio de impulso de pistón podría, por ejemplo, activarse mediante un servomotor. Sin embargo, el medio de impulso de pistón puede ser activado por la base que se mueve en la dirección axial respecto de la carcasa. Se apreciará que se pueden proporcionar medios alternativos para la administración de fluidos. Por lo tanto, por ejemplo, podría proporcionarse un recipiente cerrado que se pueda apretar para la administración de fluidos a una velocidad controlada o no controlada en lugar de un sistema de jeringa y pistón.

[0195] El aparato descrito anteriormente podría usarse para cualquier tipo de inyección. Sin embargo, se contempla particularmente útil en el campo de electroporación, por lo que puede comprender además medios para aplicar un voltaje a la aguja. Esto permite que la aguja se use no solo para inyección, sino también como un electrodo durante la electroporación. Esto es particularmente ventajoso ya que significa que el campo eléctrico se aplica al mismo área que el fluido inyectado. Tradicionalmente, existe un problema con la electroporación porque es muy difícil de alinear un electrodo de forma exacta con fluido inyectado previamente, por lo que los usuarios tienden a inyectar un volumen de fluido mayor del necesario sobre un área más grande y a aplicar un campo eléctrico sobre un área más alta para intentar garantizar una superposición entre la sustancia inyectada y el campo eléctrico. Con el uso de la presente invención, tanto el volumen de fluido inyectado como el tamaño del campo eléctrico aplicado pueden reducirse y a su vez lograr un buen ajuste entre el campo eléctrico y el fluido.

[0196] Uso en combinación

[0197] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método para tratar una infección por SARS-CoV-2, o tratar, proteger y/o prevenir una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 en un sujeto que lo necesite al administrar una combinación de una molécula de ácido nucleico que

codifica un antígeno de SARS-CoV-2, o fragmento o variante de este en combinación con uno o más agentes adicionales para el tratamiento contra una infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2. En algunas formas de realización, la enfermedad o el trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 es enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19), síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C).

[0198] La molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 y un agente adicional pueden administrarse con el uso de cualquier método adecuado de manera tal que una combinación de la molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 y el agente adicional estén ambos presentes en el sujeto. En una forma de realización, el método puede comprender la administración de una primera composición que comprende un agente para el tratamiento contra una infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o el trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 y la administración de una segunda composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 menos de 1, menos de 2, menos de 3, menos de 4, menos de 5, menos de 6, menos de 7, menos de 8, menos de 9 o menos de 10 días después de la administración de la primera composición que comprende el agente para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2. En una forma de realización, el método puede comprender la administración de una primera composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 y la administración de una segunda composición que comprende un agente para el tratamiento contra una infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 menos de 1, menos de 2, menos de 3, menos de 4, menos de 5, menos de 6, menos de 7, menos de 8, menos de 9 o menos de 10 días después de la administración de la molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2. En una forma de realización, el método puede comprender la administración de una primera composición que comprende un agente para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 y una segunda composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 de forma concurrente. En una forma de realización, el método puede

comprender la administración de una única composición que comprende un agente para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 y una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2.

[0199] En algunas formas de realización, el agente para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2 es un agente terapéutico. En una forma de realización, el agente terapéutico es un agente antiviral. En una forma de realización, el agente terapéutico es un agente antibiótico.

[0200] Los ejemplos no limitativos de antibióticos que se pueden usar en combinación con la molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno de SARS-CoV-2 de la invención incluyen aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, amikacina, tobramicina), quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, levofloxacina), cefalosporinas (por ejemplo, ceftazidima, cefepima, cefoperazona, cefpiroma, ceftobiprola), penicilinas antipseudomonas: carboxipenicilinas (por ejemplo, carbenicilina y ticarcilina) y ureidopenicilinas (por ejemplo, mezlocilina, azlocilina y piperacilina), carbapenémicos (por ejemplo, meropenem, imipenem, doripenem), polimixinas (por ejemplo, polimixina B y colistina) y monobactámicos (por ejemplo, aztreonam).

[0201] Administración como un refuerzo

[0202] En una forma de realización, la composición inmunogénica se administra como una vacuna de refuerzo después de la administración de un agente o vacuna inicial para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención o de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2, incluidos, entre otros, COVID-19, síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C). En una forma de realización, la vacuna de refuerzo se administra al menos una vez, al menos dos veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces después de la administración de un agente o vacuna inicial para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención o de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2, incluidos, entre otros, COVID-19, síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C). En una forma de realización, la vacuna de refuerzo se administra al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 16 horas, al menos 20 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 1

semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año o más de 1 año después de la administración de un agente o vacuna inicial para el tratamiento contra la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o prevención o de una enfermedad o un trastorno asociados con una infección por SARS-CoV-2, incluidos, entre otros, COVID-19, síndrome inflamatorio multisistémico del adulto (MIS-A) o síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C).

[0203] Uso en ensayos

[0204] En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico o los antígenos codificados de la invención se pueden usar en ensayos *in vivo* o *in vitro*. En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico o los antígenos codificados se pueden usar en ensayos para detectar la presencia de anticuerpos anti-proteína espicular de SARS-CoV-2. Los ensayos de ejemplo en los que las moléculas de ácido nucleico o los antígenos codificados se pueden incorporar incluyen, entre otros, transferencia Western, transferencia en mancha, métodos de resonancia de plasmones superficiales, métodos de citometría de flujo, diversos inmunoensayos, por ejemplo, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de inmunocitoquímica, ELISA, ELISA de captura, ensayos de ImmunoSpot ligado a enzimas (ELISpot), ensayos tipo sándwich, inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo de fluorescencia, y similares, los cuales son todos conocidos para las personas del oficio de nivel medio. Ver, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York; Harlow *et al.*, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

[0205] En una forma de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2, o fragmentos de este, de la invención se puede usar en un ensayo para tinción de citocinas intracelulares combinada con citometría de flujo, para evaluar las respuestas inmunitarias de los linfocitos T. Este ensayo permite la evaluación en simultáneo de múltiples parámetros fenotípicos, de diferenciación y funcionales relacionados con linfocitos T de respuesta, más notoriamente, la expresión de múltiples citocinas efectoras. Estos atributos hacen que la técnica sea particularmente adecuada para la evaluación de respuestas inmunitarias de linfocitos T inducidas por la vacuna de la invención.

[0206] En una forma de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2, o

fragmentos de este, de la invención se puede usar en un ensayo ELISpot. El ensayo ELISpot es un inmunoensayo altamente sensible que mide la frecuencia de células secretoras de citocinas al nivel de una única célula. En este ensayo, las células se cultivan en una superficie cubierta con un anticuerpo de captura específico en presencia o ausencia de estímulos. En una forma de realización, el antígeno espicular de SARS-CoV-2, o fragmentos de este, de la invención se puede usar como el estímulo en el ensayo ELISpot.

[0207] Métodos de diagnóstico

[0208] En algunas formas de realización, la invención se refiere a métodos para diagnosticar a un sujeto con infección por SARS-CoV-2 o con anticuerpos contra SARS-CoV-2. En algunas formas de realización, los métodos incluyen poner en contacto una muestra de un sujeto con un antígeno de SARS-CoV-2 de la invención, o una célula que comprende una molécula de ácido nucleico para la expresión del antígeno de SARS-CoV-2 y para detectar la unión de un anticuerpo anti-proteína espicular de SARS-CoV-2 al antígeno de SARS-CoV-2 de la invención. En tal forma de realización, la presencia en la muestra del sujeto de la unión de un anticuerpo anti-proteína espicular de SARS-CoV-2 al antígeno, o fragmente de este, de la invención indicaría que el sujeto está actualmente infectado o estuvo previamente infectado por SARS-CoV-2.

[0209] Kits y artículos de elaboración

[0210] Se proporciona en la presente un kit, que se puede usar para tratar a un sujeto mediante el uso del método de vacunación descrito anteriormente. El kit puede comprender la composición inmunogénica descrita en la presente.

[0211] El kit también puede comprender instrucciones para llevar a cabo el método de vacunación descrito anteriormente y/o cómo usar el kit. Las instrucciones incluidas en el kit se pueden adherir al material de envasado o se pueden incluir como prospecto. Si bien las instrucciones suelen ser materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. Esta divulgación contempla cualquier medio capaz de almacenar instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, entre otros, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos), medios ópticos (por ejemplo, CD-ROM) y similares. Como se usa en la presente, el término “instrucciones” puede incluir la dirección de un sitio de internet que proporciona instrucciones.

[0212] También se proporcionan en la presente artículos de elaboración que contienen la composición inmunogénica descrita en la presente. En algunas formas de

realización, el artículo de elaboración es un recipiente, tal como un vial, opcionalmente un vial de un solo uso. En una forma de realización, el artículo de elaboración es un vial de vidrio de un solo uso equipado con un tapón, que contiene la composición inmunogénica descrita en la presente que se administrará. En algunas formas de realización, el vial comprende un tapón que se puede perforar con una jeringa y un sello. En algunas formas de realización, el artículo de elaboración es una jeringa.

[0213] La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

[0214] EJEMPLOS

[0215] Ejemplo 1

[0216] Materiales y métodos

[0217] Líneas celulares. Las líneas celulares de riñón embrionario humano (HEK)-293T (ATCC® CRL-3216™) y riñón de mono verde africano COS-7 (ATCC® CRL-1651™) se obtuvieron de ATCC (Old Town Manassas, VA). Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y penicilina-estreptomicina.

[0218] Expresión de proteínas *in vitro* (transferencia Western). Las células de riñón embrionario humano 293T se cultivaron y transfectaron como se describió anteriormente (Yan, *et al.* Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther.* 2007;15(2):411-421). Los linfocitos T 293 se transfectaron con pADN con el uso del reactivo de transfección TurboFectin8.0 (OriGene), según protocolo del fabricante. Cuarenta y ocho horas más tarde, los lisados celulares se recolectaron con el uso de amortiguador de lisis celular RIPA modificado. Las proteínas se separaron en un gel BIS-TRIS al 4-12 % (ThermoFisher Scientific). Después de la transferencia, las transferencias se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-proteína espicular de SARS-CoV (Novus Biologicals), y luego se visualizaron con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Amersham).

[0219] Inmunofluorescencia de linfocitos T 293 transfectados. Para la tinción *in vitro* de la expresión de proteínas espiculares, se cultivaron linfocitos T 293 en portaobjetos de vidrio de 4 cavidades (Lab-Tek) y se transfectaron con 3 µg/cavidad de pADN con el uso del reactivo de transfección TurboFectin8.0 (OriGene), según el protocolo del fabricante. Las células se fijaron 48 horas después de la transfección con 10 % de formalina neutra amortiguada (BBC Biochemical, Washington State) durante 10 min a temperatura ambiente (RT) y luego se lavaron con PBS. Antes de la tinción, los

portaobjetos de cámara se bloquearon con 0,3 % (v/v) de Triton-X (Sigma), 2 % (v/v) de suero de burro en PBS durante 1 hora a RT. Las células se tiñeron con un anticuerpo policlonal anti-proteína espicular de SARS-CoV (Novus Biologicals) diluido en 1 % (p/v) de BSA (Sigma), 2 % (v/v) de suero de burro, 0,3 % (v/v) de Triton-X (Sigma) y 0,025 % (v/v) de 1 g/ml de azida de sodio (Sigma) en PBS durante 2 horas a RT. Los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 min en PBS y luego se tiñeron con AF488 de burro anti-IgG de conejo (Life Technologies, A21206) durante 1 hora a RT. Los portaobjetos se lavaron otra vez y se montaron y cubrieron con DAPI-Fluoromount (SouthernBiotech).

[0220] Expresión de ARN *in vitro* (qRT-PCR). La expresión del mRNA *in vitro* del plásmido se demostró mediante la transfección de COS-7 con plásmidos diluidos en serie, seguido por el análisis del ARN total extraído de las células con el uso de transcripción inversa y PCR. Se realizaron transfecciones de cuatro concentraciones del plásmido con reactivo de transfección FuGENE® 6 (Promega) que dio como resultado masas finales en un intervalo entre 80 y 10 ng/cavidad. Las transfecciones se realizaron en duplicado. Después de 18 a 26 horas de incubación, las células se lisaron con amortiguador RLT (Qiagen). El ARN total se aisló de cada cavidad con el kit de Qiagen RNeasy, según las instrucciones del kit. La concentración de ARN resultante se determinó mediante OD_{260/280} y las muestras del ARN se diluyeron hasta 10 ng/μL. Luego, se convirtieron cien nanogramos de ARN en cADN con el uso del kit de transcripción inversa (RT) de cADN de alta capacidad (Applied Biosystems), según las instrucciones del kit. Las reacciones a RT que contienen ARN pero no transcriptasa inversa (menos RT) se incluyeron como controles para contaminación de muestras de ADN plasmídico o ADN genómico celular. Luego, ocho μL de cADN de muestra se sometieron a PCR con el uso de cebadores y sondas que son específicos de la secuencia diana (pGX9501 directo – CAGGACAAGAACACACAGGAA (SEQ ID NO: 7); pGX9501 inverso – CAGGCAGGATTTGGGAGAAA (SEQ ID NO: 8); sonda pGX9501 – ACCCATCAAGGACTTTGGAGG (SEQ ID NO: 9); y pGX9503 directo– AGGACAAGAACACACAGGAAG (SEQ ID NO: 10); pGX9503 inverso – CAGGATCTGGGAGAAGTTGAAG (SEQ ID NO: 11); sonda pGX9503 – ACACCACCATCAAGGACTTTGGA (SEQ ID NO: 12)). En una reacción separada, la misma cantidad de cADN de muestra se sometió a PCR con el uso de cebadores y una sonda diseñada para secuencias de β-actina de la línea celular COS-7 (β-actina directa – GTGACGTGGACATCCGTAAA (SEQ ID NO: 13); β-actina inversa – CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG (SEQ ID NO: 14); sonda β-actina –

TACCCTGGCATTGCTGACAGGATG (SEQ ID NO: 15)). Los cebadores y las sondas se sintetizaron mediante Integrated DNA Technologies, Inc. y las sondas se etiquetaron con 56-FAM y Black Hole Quencher 1. La reacción usó ABI Fast Advance 2X (N.º de catálogo 4444557), con concentraciones de cebador directo e inverso finales de 1µM y concentraciones de sonda de 0,3 µM. Con el uso de un sistema de estudio de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex (Applied Biosystems), las muestras primero se sometieron a una espera de 1 minuto a 95 °C y luego 40 ciclos de PCR, donde cada ciclo consiste en 1 segundo a 95 °C y 20 segundos a 60 °C. Después del PCR, los resultados de las amplificaciones se analizaron de la siguiente manera. Los controles de transfección negativa (NTC), los controles menos RT y los NTC se analizaron para cada una de sus respectivas indicaciones. El ciclo umbral (C_T) de cada concentración de transfección para el mRNA diana de SARS-CoV-2 INO-4800 y para el mRNA de β -actina se generó a partir del *software* QuantStudio™ con el uso de una configuración de umbral automática. El plásmido se consideró activo para la expresión de mRNA si la expresión en cualquiera de las cavidades transfectadas con plásmido era mayor de 5 C_T en comparación con los controles de transfección negativa. Animales. Se compraron ratones hembra C57/BL6 y BALB/c de 6 semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Malvern, PA) y The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se compraron cobayos Hartley hembra de 8 semanas de edad a través de Elm Hill Labs (Chelmsford, MA). Todos los animales se alojaron en el centro de animales en The Wistar Institute Animal Facility o Acculab Life Sciences (San Diego, CA). Todas las pruebas e investigaciones en animales cumplieron con todas las normas éticas y los estudios recibieron la aprobación ética del Wistar Institute o Comités Institucionales para el cuidado y uso de animales de Acculab (IACUC). Para los estudios de ratón, el día 0 se administraron dosis de 2,5, 10 o 25 µg de pADN en el músculo tibial anterior (TA) mediante inyección de aguja, seguido por electroporación (EP) *in vivo* CELLECTRA®. La administración por EP CELLECTRA® consiste en dos conjuntos de pulsos con corriente constante de 0,2 amperes. El conjunto del segundo pulso se retrasa 3 segundos. Dentro de cada conjunto hay dos pulsos de 52 ms con un retraso de 198 ms entre los pulsos. La sangre se recolectó los días 0 y 14. Los grupos paralelos de ratones se sacrificaron en serie los días 4, 7 y 10 después de la inmunización para el análisis de respuestas inmunitarias celulares. Para los estudios de cobayos, el día 0 se administraron 100 µg de pADN en la piel mediante inyección Mantoux, seguido de EP *in vivo* CELLECTRA®.

[0221] ELISA de unión a antígeno. Se realizaron ELISA para determinar títulos de

unión a anticuerpo en sueros. Se cubrieron placas de ELISA Nunc con 1 µg/ml de antígenos de proteína recombinante en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces, luego se bloquearon con 3 % de albúmina de suero bovino (BSA) en DPBS con 0,05 % de Tween 20 durante 2 horas a 37 °C. Luego las placas se lavaron e incubaron con diluciones en serie de sueros de ratón o cobayo y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las placas se volvieron a lavar y luego se incubaron con dilución 1:10,000 de anticuerpo secundario anti-IgG de cobayo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich, catálogo A7289) o anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 1 hora a RT. Después del lavado final, las placas se desarrollaron con el uso del sustrato de peroxidasa de 1 componente TMB SureBlue™ (KPL, catálogo 52-00-03), y la reacción se detuvo con solución de detención de TMB (KPL, catálogo 50-85-06). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm dentro de los 30 minutos con el uso de un lector de placas HTX Synergy™ (BioTek Instruments, Highland Park, VT). Los títulos de valoración (EPT) de anticuerpo de unión se calcularon como se describió anteriormente (Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, *et al.* Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci Transl Med.* 2012; 4(155):155ra138). Los antígenos de unión evaluados incluidos, antígenos de SARS-CoV-2: proteína espicular S1 (Sino Biological 40591-V08H), proteína espicular ECD S1+S2 (Sino Biological 40589- V08B1), RBD (Universidad de Texas, en Austin (McLellan Lab.)); antígenos de SARS-COV: proteína espicular S1 (Sino Biological 40150-V08B1), S (1-1190) (Immune Tech IT-002-001P) y terminal C espicular (Meridian Life Science R18572).

[0222] ELISA de competencia ACE2. Para los estudios de ratón, los ELISA se realizaron para determinar la competencia de anticuerpo IgG en sueros contra ACE2 humano con una etiqueta Fc humana. Se cubrieron placas de ELISA Nunc con 1 µg/ml de anti-His6X de conejo en 1X PBS durante 4-6 horas a temperatura ambiente (RT) y se lavaron 4 veces con amortiguador de lavado (1X PBS y 0,05 % de Tween® 20). Las placas se bloquearon durante la noche a 4 °C con amortiguador de bloqueo (1X PBS, 0,05 % de Tween® 20, 5 % de leche evaporada y 1 % de FBS). Las placas se lavaron cuatro veces con amortiguador de lavado y luego se incubaron con proteína espicular (S1+S2) de longitud completa que contiene una etiqueta His del terminal C (Sino Biologicals, catálogo 40589-V08B1) a 10 µg ml⁻¹ durante 1 hora a RT. Las placas se lavaron y luego las diluciones en serie de IgG de ratón purificado con 0,1 µg ml⁻¹ de

ACE2 humano recombinante con una etiqueta Fc humana (ACE2-IgHu) se incubaron durante 1-2 horas a RT. Las placas se volvieron a lavar y luego se incubaron con dilución 1:10,000 de anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Bethyl, catálogo A80-304P) y se incubaron durante 1 hora a RT. Después del lavado final, las placas se desarrollaron con el uso del sustrato TMB-ELISA Ultra de 1 etapa (Thermo, catálogo 34029) y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm dentro de los 30 minutos con el uso de un lector de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competencia se graficaron y el área bajo la curva (AUC) se calculó con el *software* de análisis Prism 8 con múltiples pruebas t para determinar la importancia estadística.

[0223] Para los estudios de cobayo, se recubrieron placas de ensayo de mitad de área de 96 cavidades (Costar) con 25 µL por cavidad de 5 µg/ml de proteína espicular S1+S2 de SARS-CoV-2 (Sino Biological) diluida en 1x DPBS (Thermofisher) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con amortiguador 1xPBS con 0,05 % de TWEEN® 20 (Sigma). Se agregaron 100 µL por cavidad de 3 % (p/v) de BSA (Sigma) en 1x PBS con 0,05 % de TWEEN® 20 y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las muestras de suero se diluyeron 1:20 en 1 % (p/v) de BSA en 1x PBS con 0,05 % de TWEEN. Después de lavar la placa de ensayo, se agregaron 25 µL/cavidad de suero diluido y se incubó 1 h a 37 °C. Se agregó ACE2 humano recombinante con etiqueta Fc (Sinobiological) directamente al suero diluido, seguido por 1 h de incubación a 37 °C. Las placas se lavaron y se agregaron 25 µL por cavidad de 1:10,000 anticuerpo HRP anti-fragmento de Fc humano de cabra diluido (Bethyl, A80-304P) a la placa de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 h a RT. Para el desarrollo, se usó la solución de detención SureBlue/TMB (KPL, MD) y la O. D. se registró en 450 nm.

[0224] Ensayo de neutralización del pseudovirus de SARS-CoV-2. Los virus pseudotipados de SARS-CoV-2 se produjeron con linfocitos HEK293T transfectados con GeneJammer (Agilent) con el uso de plásmido S de SARS-CoV-2 e IgE (Genscript) y plásmido pNL4-3.Luc.R-E (reactivo AIDS NIH) a una relación de 1:1. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recolectó el sobrenadante de la transfección, enriquecido con FBS a un volumen final de 12 %, filtrado con Steri (Millipore Sigma) y se dividió en alícuotas para almacenamiento a -80 °C. Los virus pseudotipados de SARS-CoV-2 se titularon y produjeron más de 50 veces las unidades de luminiscencia relativa (RLU) que las células solas después de 72 h de infección. Los sueros de ratón de los grupos vacunados con INO-4800 y sin

tratamiento previo se calentaron inactivados durante 15 minutos a 56 °C y se diluyeron en serie tres veces comenzando por una dilución 1:10 para el ensayo. Los sueros se incubaron con una cantidad fija de virus pseudotipados de SARS-CoV-2 durante 90 minutos. Se agregaron linfocitos HEK293T que expresan ACE2 de forma estable después de 90 minutos y se dejaron incubar en incubadora estándar (37 % de humedad, 5 % de CO₂) durante 72 horas. Después de la infección, las células se lisaron con el uso del sistema de ensayo del gen indicador de luminiscencia britelite™ plus (Perkin Elmer N.º de catálogo 6066769) y las unidades de luminiscencia relativa (RLU) se midieron con el lector de placas Biotek. Los títulos de neutralización (ID₅₀) se calcularon como la dilución de suero a la que las RLU se redujeron en un 50 % en comparación con las RLU en las cavidades de control de virus después de sustracción de RLU de fondo en las cavidades de control celular.

[0225] Ensayos de neutralización de virus de tipo silvestre de SARS-CoV-2. Los ensayos de neutralización de SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 aislado se realizaron en Public Health England (Porton Down, Reino Unido). Los títulos de virus neutralizantes se midieron en las muestras de suero que se habían inactivado con calor a 56 °C durante 30 minutos. Se diluyó SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020 aislado) (Caly *et al.*, Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. *Med. J. Aust.* (2020) doi: 10.5694/mja2.50569; publicado en línea: 13 de abril de 2020) a una concentración de 933 pfu/ml y se mezcló 50:50 en 1 % de FCS/MEM que contiene 25 mM de amortiguador HEPES con diluciones de suero de duplicación de 1:10 a 1:320 en una placa con fondo en V de 96 cavidades. La placa se incubó a 37 °C en una caja humidificada durante 1 hora antes de que el virus se transfiera a las cavidades de una placa de 24 cavidades lavada dos veces con DPBS que se había sembrado el día anterior a 1,5 x 10⁵ células Vero E6 por cavidad en 10 % de FCS/MEM. El virus se dejó adsorber a 37 °C durante una hora adicional y se revistió con medio de revestimiento del ensayo de placas (1X MEM/1,5 % de CMC/4 % de FCS final). Después de 5 días de incubación a 37 °C en una caja humidificada, las placas se fijaron, se tiñeron y se contaron las placas. Los títulos neutralizantes de la mediana (ND50) se determinaron con el uso de la fórmula de Spearman-Kärber relacionada con las cavidades de control solo de virus.

[0226] Los ensayos de neutralización de SARS-CoV-2/WH-09/human/2020 aislado se realizaron en el Instituto de Ciencias de Animales de Laboratorio, Academia China de Ciencias Médicas (CAMS), aprobado por la Comisión Nacional de la Salud de la

República Popular China. Los estudios de reservas de SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/WH-09/human/2020) sembrado y de aislamiento de virus se realizaron en células Vero E6, que se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, y se incubaron a 36,5 °C, 5 % de CO₂. Los títulos del virus se determinaron con el uso de un ensayo de 50 % de dosis de infección en cultivo tisular (TCID₅₀) estándar. Las muestras de suero recolectadas de animales inmunizados se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos y se diluyeron en serie con medio de cultivo celular en etapas de dos veces. Las muestras diluidas se mezclaron con una suspensión de virus de 100 TCID₅₀ en placas de 96 cavidades a una relación de 1:1, seguido por 2 horas de incubación a 36,5 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. Luego, 1-2 × 10⁴ células Vero se agregaron a la mezcla de suero-virus, y las placas se incubaron durante 3-5 días a 36,5 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. El efecto citopático (CPE) de cada cavidad se registró a través de microscopios y el título neutralizante se calculó mediante la cantidad de dilución de 50 % de condición protectora.

[0227] Recolección de lavado broncoalveolar. El fluido de lavado broncoalveolar (BAL) se recolectó al lavar los pulmones de ratones sometidos a eutanasia y exangües con 700-1000 µl de PBS helado que contenía 100 µM de EDTA, 0,05 % de azida de sodio, 0,05 % de Tween® 20 y 1x de inhibidor de proteasa (Pierce) (soluciones de preparación de mucosa (MPS)) con una aguja de extremo romo. Los pulmones de cobayo se lavaron con 20 ml de MPS con un catéter 16G insertado en la tráquea.

El fluido BAL recolectado se almacenó a -20 °C hasta el momento del ensayo.

[0228] ELISpot de IFN γ . Ratones: Se recolectaron bazo de ratones de forma individual en medio RPMI1640 complementado con 10 % de FBS (R10) y penicilina/estreptomicina y se procesó en suspensiones de una sola célula. Los pélets celulares se volvieron a suspender en 5 ml de amortiguador de lisis ACK (Life Technologies, Carlsbad, CA) durante 5 min a temperatura ambiente, y luego se agregó PBS para detener la reacción. Las muestras se volvieron a centrifugar a 1.500 g durante 10 min, los pélets celulares se volvieron a suspender en R10 y luego se pasaron a través de un filtro de nylon de 45 µm antes de usarlo en el ensayo ELISpot. Los ensayos ELISpot se realizaron con las placas ELISpot^{PLUS} de IFN- γ de ratón (MABTECH). Las placas ELISpot de 96 cavidades se precubiertas con anticuerpo de captura se bloquearon con medio R10 durante la noche a 4 °C. Se colocaron en placas 200.000 esplenocitos de ratón en cada cavidad y se estimularon durante 20

horas con grupos de péptidos 15-mer superpuestos por 9 aminoácidos de las proteínas espiculares de SARS-CoV-2, SARS-CoV o MERS-CoV (5 grupos de péptidos por proteína). Adicionalmente, el mapeo de matriz se realizó con grupos de péptidos en una matriz diseñada para identificar respuestas inmunodominantes. Las células se estimularon con una concentración final de 5 µl de cada péptido/cavidad en RPMI + 10 % de FBS (R10). Los puntos se desarrollaron en función de las instrucciones del fabricante. Se usó R10 y cócteles de estimulación celular (Invitrogen) para controles negativos y positivos, respectivamente. Los puntos se escanearon y cuantificaron mediante el lector CTL ImmunoSpot™. La unidad de formación de punto (SFU) cada millón de células se calculó al restar las cavidades de control negativo.

[0229] Citometría de flujo. Se realizó tinción de citocinas intracelulares en esplenocitos recolectados de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con los péptidos superpuestos que abarcan la proteína S de SARS-CoV-2 durante 6 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos de BD Biosciences, a menos que se indique, con las diluciones entre paréntesis: FITC anti-CD107a de ratón (1:100), PerCP-Cy5,5 anti-CD4 de ratón (1:100), APC anti-CD8a de ratón (1:100), ViViD Dye (1-40) (kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD® Fixable Violet; Invitrogen, L34955), APC-Cy7 anti-CD3e de ratón (1:100) y BV605 anti-IFN-γ de ratón (1:75) (eBiosciences). Se usó acetato de miristato de forbol (PMA) como control positivo y el medio completo solo como control negativo. Las células se lavaron, se fijaron y los eventos celulares se adquirieron con el uso de un FACS CANTO (BD Biosciences), seguido por análisis del *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR).

[0230] Estadísticas. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del *software* GraphPad Prism 7 u 8 (La Jolla, CA). Estos datos se consideraron significativos si $p < 0,05$. Las líneas en todos los gráficos representan el valor de la media y las barras de error representan la desviación estándar. No se excluyeron muestras ni animales del análisis. No se realizó aleatorización para los estudios en animales. Las muestras y los animales no estaban enmascaradas antes de realizar cada experimento.

[0231] Resultados

[0232] Diseño y síntesis de constructos de vacuna de ADN contra SARS-CoV-2

[0233] Se recuperaron cuatro secuencias de proteína espicular de las primeras cuatro secuencias disponibles del genoma completo de SARS CoV-2 publicadas en GISAID (Iniciativa global para compartir todos los datos de influenza). Tres secuencias de

espícula coincidieron en un 100 % y una se consideró un valor atípico (98,6 % de identidad de secuencia con las otras secuencias). Después de realizar una alineación de secuencia, se generó la secuencia de glucoproteínas espiculares de SARS-CoV-2 (“antígeno espicular de Covid-19”; SEQ ID NO: 1) y se agregó una secuencia líder de IgE de N terminal. La secuencia de ADN altamente optimizada que codifica la espícula de IgE de SARS-CoV-2 se creó como se describe en la presente en otra parte para mejorar la expresión e inmunogenicidad. Se generó la secuencia de glucoproteínas espiculares de SARS-CoV-2 de valor atípico (“antígeno OL espicular de Covid-19”; SEQ ID NO: 4) y se agregó una secuencia líder de IgE de N terminal. La secuencia de ADN optimizada se sintetizó, se digirió con BamHI y XhoI, y se clonó en el vector de expresión pGX0001 bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano y una señal de poliadenilación de una hormona de crecimiento bovina. Los plásmidos resultantes se denominaron pGX9501 y pGX9503, diseñados para codificar la proteína S de SARS-CoV-2 de las 3 secuencias emparejadas y la secuencia de valor atípico, respectivamente (**Figura 1A**).

[0234] Caracterización *in vitro* de constructos de vacuna de ADN sintético

[0235] Se midió la expresión del transgén espicular de SARS-CoV-2 codificado en el nivel de ARN en células COS-7 transfectadas con pGX9501 y pGX9503. Con el uso del ARN total extraído de las células COS-7 transfectadas, la expresión del transgén espicular se confirmó mediante RT-PCR (**Figura 1B**). La expresión de proteínas espiculares *in vitro* en linfocitos T 293 se midió mediante análisis de transferencia Western con el uso de un anticuerpo de reactividad cruzada contra la proteína S de SARS-CoV en lisados celulares. Las transferencias Western de los lisados de linfocitos HEK-293T transfectados con constructos pGX9501 o pGX9503 revelaron bandas aproximadas al peso molecular de la proteína S previsto, 140-142 kDa, con pequeños cambios, probablemente a causa de los 22 posibles glicanos unidos a N en la proteína S (**Figura 1C**). En estudios de inmunofluorescencia, la proteína S se detectó en linfocitos T 293 transfectados con pGX9501 o pGX9503 (**Figura 1D**). En resumen, los estudios *in vitro* revelaron la expresión de la proteína espicular tanto en el nivel de ARN como en el nivel de la proteína después de la transfección de líneas celulares con los constructos de vacuna candidatos.

[0236] Respuestas inmunitarias humorales en ratones. Se seleccionó pGX9501 como el constructo de vacuna para avanzar a estudios de inmunogenicidad a causa de la cobertura más amplia que probablemente proporcionaría en comparación con el de valor atípico, pGX9503. El pGX9501 se nombró posteriormente INO-4800. La

inmunogenicidad de INO-4800 se evaluó en ratones BALB/c después de la administración en el músculo tibial anterior con el uso del dispositivo de administración CELLECTRA®. (Sardesai y Weiner, Curr. Opin. Immunol., 23, 421-429 (2011). La reactividad de los sueros de un grupo de ratones inmunizados con INO-4800 se midió contra un panel de antígenos de SARS-CoV-2 y de SARS-CoV (**Figura 2**). El análisis reveló la unión de IgG contra antígenos de la proteína S de SARS-CoV-2, con reactividad cruzada limitada a los antígenos de la proteína S de SARS-CoV en los sueros de ratones inmunizados con INO-4800. Se midieron los títulos de valoración de unión de IgG en suero en ratones inmunizados con pADN contra las regiones S1+S2 de la proteína espicular de SARS-CoV-2 recombinante (**Figuras 3A y 3B**) y el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espicular de SARS-CoV-2 recombinante (**Figuras 3C y 3D**). Los títulos de valoración se observaron en los sueros de ratones el día 14 después de la inmunización con una sola dosis de INO-4800 (**Figuras 3B, 3C, 3D**).

[0237] Ensayo de neutralización. Se desarrolló un ensayo de neutralización con un pseudovirus en función de pNL4-3.Luc.R-E que muestra la proteína espicular de SARS-CoV-2. Los títulos de neutralización se detectaron mediante una reducción en las unidades de luciferasa relativa (RLU) en comparación con controles que no tuvieron disminución en la señal de RLU. Los ratones BALB/c se inmunizaron dos veces con INO-4800 en los días 0 y 14, y el suero se recolectó el día 7 después de la segunda inmunización. El pseudovirus se incubó con diluciones en serie de sueros de ratón y se agregó la mezcla sueros-virus a linfocitos T 293 que expresan el receptor de ACE2 humano (ACE2-293T) de forma estable durante 72 horas. Se observaron títulos ID50 de neutralización promedio de 92,2 en ratones inmunizados con INO-4800 (**Figuras 4A y 4B**). No se observó reducción en RLU para los animales de control. Los títulos neutralizantes se midieron adicionalmente contra dos cepas de virus de SARS-CoV-2 de tipo silvestre mediante ensayo de prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT). Los sueros de ratones BALB/c inmunizados con INO-4800 neutralizaron las cepas virales de SARS-CoV-2/WH-09/humano/2020 y SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 con títulos ND50 promedio de 97,5 y 128,1, respectivamente (**Tabla 1**). Los títulos neutralizantes de virus vivo también se evaluaron en ratones C57BL/6 siguiendo el mismo régimen de inmunización INO-4800. Los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con INO-4800 neutralizaron los virus de SARS-CoV-2 de tipo silvestre con títulos ND50 promedio de 340 (**Tabla 1**).

[0238] Tabla 1. Actividad neutralizante de sueros después de administración de

INO-4800 a ratones y cobayos.

Modelo	Vacuna	N	Régimen de inmunización	Punto de temporal de la muestra	Ensayo de neutralización	Suero ND50 (Dilución recíproca)
Ratón BALB/c	pVAX	4	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 (WH-09/humano/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 (WH-09/humano/2020)	30, 40, 80, 240
	pVAX	8	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 24
	INO-4800	8	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	27, 46, 91, 108, 130, 161, 221, 241
	pVAX	5	10 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 Pseudovirus	8, 8, 8, 8, 8
	INO-4800	5	10 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 Pseudovirus	43, 55, 87, 129, 147
	pVAX	4	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2	<20, <20, <20, <20
Ratón C57BL/6					(WH-09/humano/2020)	
	INO-4800	4	25 µg Días 0, 14	Día 21	SARS-CoV-2 (WH-09/humano/2020)	240, 240, 240, 640
Cobayo	pVAX	5	100 µg Días 0, 14, 28	Día 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 14, 20, 21, 25
	INO-4800	5	100 µg Días 0, 14, 28	Día 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	>320, >320, >320, >320, >320
	pVAX	5	100 µg Días 0, 14, 28	Día 35	SARS-CoV-2 Pseudovirus	<20, <20, <20, <20, <20
	INO-4800	5	100 µg Días 0, 14, 28	Día 35	SARS-CoV-2 Pseudovirus	527, 532, 579, 614, 616
Conejo blanco de Nueva Zelanda	SSC	5	Días 0, 28	Día 42	SARS-CoV-2 Pseudovirus	<10, <10, <10, <10, <10
	INO-4800	5	1 mg, días 0, 28	Día 42	SARS-CoV-2 Pseudovirus	12, 23, 32, 148, 178
	INO-4800	5	2 mg, Días 0, 28	Día 42	SARS-CoV-2 Pseudovirus	202, 237, 252, 455, 995
Primates no humanos	INO-4800	5	1 mg, días 0, 28	Día 42	SARS-CoV-2 Pseudovirus	15, 27, 55, 61, 1489
	INO-4800	5	2 mg, Días 0, 28	Día 42	SARS-CoV-2 Pseudovirus	78, 23, 13, 48, <10

[0239] Se evaluó la inmunogenicidad de INO-4800 en el modelo de cobayo Hartley, un modelo establecido para administración de vacuna intradérmica (Carter, *et al.* The adjuvant GLA-AF enhances human intradermal vaccine responses. *Sci Adv.* 2018;4(9):eaas9930; Schultheis, *et al.* Characterization of guinea pig T cell responses elicited after EP-assisted delivery of DNA vaccines to the skin. *Vaccine.* 2017;35(1):61-

70). Se administraron 100 µg de pADN mediante inyección Mantoux a la piel y siguió el dispositivo CELLECTRA® en el día como se describió en la sección de métodos anterior. El día 14, se midió la unión a anti-proteína espicular de anticuerpos en suero mediante ELISA. La inmunización con INO-4800 reveló una respuesta inmunitaria con respecto a los niveles de IgG en los sueros de la unión de proteína S1+2 de SARS-CoV-2 (**Figuras 5A y 5B**). El título de valoración de unión a la proteína S de SARS-CoV-2 el día 14 fue de 10,530 y 21 en cobayos tratados con 100 µg de INO-4800 o pVAX (control), respectivamente (**Figura 5B**). Se evaluó la actividad neutralizante de anticuerpos después de la inmunización con INO-4800 intradérmica en el modelo de cobayo. Los cobayos se trataron los días 0, 14 y 28 con pVAX o INO-4800, y las muestras de sueros se recolectaron los días 35 o 42 para medir la actividad neutralizante de sueros contra pseudovirus o virus de tipo silvestre, respectivamente. Se observó la actividad neutralizante del pseudovirus de SARS-CoV-2 con títulos ND50 promedio de 573,5 para los cobayos inmunizados con INO-4800 (Tabla 1). También se observó la actividad del virus de SARS-CoV-2 de tipo silvestre para los cobayos inmunizados con INO-4800 con títulos ND50 >320 mediante ensayo PRNT observado en todos los animales (Tabla 1). Se midió adicionalmente la funcionalidad de los anticuerpos en suero al evaluar su capacidad de inhibir la unión de ACE2 a la proteína espicular de SARS-CoV-2. El suero (dilución 1:20) recolectado de cobayos inmunizados con INO-4800 después de la segunda inmunización inhibió la unión de la proteína espicular de SARS-CoV-2 sobre un rango de concentraciones de ACE-2 (0,25 µg/ml a 4 µg/ml) (**Figura 6E**). Además, las curvas de dilución de suero revelaron que el suero recolectado de cobayos inmunizados con INO-4800 bloquearon la unión de ACE-2 a SARS-CoV-2 de una manera dependiente de la dilución (**Figura 6F**). El suero recolectado de los animales tratados con pVAX demostró actividad insignificante en la inhibición de la unión de ACE-2 a la proteína del virus, la disminución en la señal OD en la mayor concentración del suero se considera un efecto de matriz en el ensayo.

[0240] Inhibición de la unión de la proteína S de SARS-CoV-2 al receptor de ACE2. Se examinó la funcionalidad de inhibición de respuestas de anticuerpos inducidos por INO-4800 del receptor. Se desarrolló un ensayo de inhibición de ACE2 a base de ELISA como un sustituto para la neutralización. Como un control en el ensayo, se muestra que ACE2 se une a la proteína espicular de SARS-CoV-2 con un EC50 de 0,025 µg/ml (**Figura 6A**). Los ratones BALB/c se inmunizaron el día 0 y el día 14 con 10 µg de INO-4800 y la IgG en suero se purificó el día 21 después de la inmunización para asegurar que la inhibición esté intervenida por anticuerpos. Se

comparó la inhibición de la interacción espícula-ACE2 con el uso de IgG en suero de un ratón sin tratamiento y de un ratón vacunado con INO-4800 (**Figura 6B**). El ensayo de inhibición del receptor se repitió con un grupo de cinco ratones inmunizados, lo que demostró que los anticuerpos inducidos con INO-4800 competían con la unión de ACE2 a la proteína espicular de SARS-CoV-2 (**Figura 6C y 6 F**). La inhibición de la unión de ACE2 se evaluó adicionalmente en el modelo de cobayo. Los sueros recolectados de cobayos inmunizados con INO-4800 inhibieron la unión de la proteína espicular de SARS-CoV-2 sobre un rango de concentraciones de ACE-2 (0,25 µg/ml a 4 µg/ml) (**Figura 6D**). Además, las curvas de dilución de suero revelaron que los sueros recolectados de cobayos inmunizados con INO-4800 bloquearon la unión de ACE-2 a SARS-CoV-2 de una manera dependiente de la dilución (**Figura 6E**). Los sueros recolectados de los animales tratados con pVAX demostró actividad insignificante en la inhibición de la unión de ACE-2 a la proteína del virus, la disminución en la señal OD en la mayor concentración del suero se considera un efecto de matriz en el ensayo. La **Figura 6F** representa que las IgG purificadas de n=5 ratones el día 14 después de la segunda inmunización con INO-4800 presentan competencia contra el receptor de ACE2 que se une a la proteína espicular del SARS-CoV-2 en comparación con las IgG agrupadas de ratones sin tratamiento.

[0241] En resumen, las pruebas de inmunogenicidad en ratones y cobayos reveló que el candidato de vacuna contra SARS-CoV-2, INO-4800, fue capaz de provocar respuestas de anticuerpos ante la proteína espicular de SARS-CoV-2. ACE2 se considera el receptor primario para la entrada celular de SARS-CoV-2, por lo que bloquear esta interacción sugiere que los anticuerpos inducidos por INO-4800 puede prevenir la infección del huésped.

[0242] Biodistribución de IgG reactiva a SARS-CoV-2 en el pulmón. La enfermedad de las vías respiratorias inferiores (LRD) está asociada con casos graves de COVID-19. La presencia de anticuerpos en la mucosa de los pulmones que se dirigen a SARS-CoV-2 potencialmente podría mediar la protección contra LRD. Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 en los pulmones de ratones y cobayos inmunizados. Los ratones BALB/c y cobayos Hartley fueron inmunizados los días 0 y 14 o 0, 14 y 28, respectivamente, con INO-4800 o pADN de control de pVAX. El fluido de lavado broncoalveolar (BAL) se recolectó después de la eutanasia y se realizaron ELISA de la proteína S de SARS-CoV-2. Tanto en los ratones BALB/c como en los cobayos Hartley que recibieron INO-4800, se midió un aumento estadísticamente significativo en IgG de unión a la proteína S de SARS-CoV-

2 en fluido de BAL en comparación con los animales que recibieron el control de pVAX (**Figuras 7A-7D**). En conjunto, estos datos demuestran la presencia del anticuerpo específico anti-SARS-CoV-2 en los pulmones después de la inmunización con INO-4800.

[0243] Respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada de coronavirus en ratones. Las respuestas de linfocitos T contra los antígenos S de SARS-CoV-2, SARS-CoV y MERS-CoV se ensayaron mediante ELISpot de IFN γ . Los grupos de ratones BALB/c se sometieron a eutanasia los días 4, 7 o 10 después de la administración de INO-4800 (2,5 o 10 μ g de pADN), se recolectaron esplenocitos y se estimuló una suspensión de una única célula durante 20 horas con grupos de péptidos 15-mer superpuestos que abarcan la proteína espicular de SARS-CoV-2, SARS-CoV y MERS-CoV. El día 7 después de la administración de INO-4800, se midieron respuestas de linfocitos T de 205 y 552 SFU por cada 10^6 esplenocitos contra SARS-CoV-2 para las dosis de 2,5 y 10 μ g, respectivamente (**Figura 8A**). Se observaron respuestas de mayor magnitud de 852 y 2,193 SFU por cada 10^6 esplenocitos contra SARS-CoV-2 el día 10 después de la administración de INO-4800. Adicionalmente, se evaluó la reactividad cruzada de la respuesta celular provocada por INO-4800 contra SARS-CoV, lo que mostró respuestas de linfocitos T detectables, aunque menores, tanto el día 7 (74 [dosis de 2,5 μ g] y 140 [dosis de 10 μ g] SFU por cada 10^6 esplenocitos) como el día 10 después de la administración (242 [dosis de 2,5 μ g] y 588 [dosis de 10 μ g] SFU por cada 10^6 esplenocitos) (**Figura 8B**). Curiosamente, no se observaron respuestas de linfocitos T de reacción cruzada contra péptidos de MERS-CoV (**Figura 8C**). Las imágenes representativas de las placas de ELISpot de IFN γ se proporcionan en la **Figura 31**. Se identificaron las poblaciones de linfocitos T que estaban produciendo IFN- γ . El análisis de citometría de flujo en los esplenocitos recolectados de ratones BALB/c el día 14 después de una sola inmunización de INO-4800 reveló que el compartimento de linfocitos T contenía 0,04 % de linfocitos T CD4+ y 0,32 % de linfocitos T CD8+ de IFN- γ + después de la estimulación con antígenos de SARS-CoV-2 (**Figura 32**).

[0244] Mapeo de epítomos de SARS-CoV-2 en BALB/c. Se realizó mapeo de epítomos en los esplenocitos de ratones BALB/c que recibieron la dosis de 10 μ g de INO-4800. Treinta grupos de mapeo de matriz se usaron para estimular esplenocitos durante 20 horas y se detectaron respuestas inmunodominantes en múltiples grupos de péptidos (**Figura 14A**). Las respuestas se deconvolucionaron para identificar diversos agrupamientos de epítomos (H2-Kd) en el dominio de unión al receptor y en el

dominio S2 (**Figura 14B**). Curiosamente, se observó que un epítipo H2-Kd de SARS-CoV-2, PHGVVFLHV (SEQ ID NO: 16), estaba superpuesto y adyacente al epítipo restringido HLA-A2 humano de SARS-CoV VVFLHVTYV (SEQ ID NO: 17).

[0245] En resumen, se detectaron respuestas de linfocitos T contra epítopos de proteína S de SARS-CoV-2 en ratones inmunizados con INO-4800.

[0246] **Ejemplo 2: Respuestas inmunitarias celulares y humorales medidas en conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) tratados con INO-4800.**

[0247] Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISpot de IFN- γ de PBMC (**Figura 9**); ELISA de unión de IgG en suero (**Figura 10**).

[0248] **Ejemplo 3**

[0249] **Respuestas inmunitarias humorales a la proteína espicular de SARS-CoV-2 medidas en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800.** Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISA de unión de IgG en suero. (**Figuras 11A-11E**).

[0250] **Respuestas inmunitarias humorales a la proteína espicular de SARS y MERS medidas en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800.** Administración de pADN por vía intradérmica los días 0 y 28. ELISA de unión de IgG en suero. (**Figuras 12A-12G**; panel izquierdo, 1 mg INO-4800; panel derecho, 2 mg de INO-4800). **Respuestas inmunitarias celulares medidas mediante ELISpot de IFN- γ de PBMC en *Macaca mulatta* tratados con INO-4800 después de la administración intradérmica de pADN los días 0 y 28.** Los resultados se muestran en la **Figura 13A** (péptidos espiculares de SARS CoV-2); **13B** (péptidos espiculares de SARS CoV); y **13C** (péptidos espiculares de MERS CoV).

[0251] **Ejemplo 4: Ensayo ELISA de la espícula del SARS-CoV-2 con INO-4800**

[0252] La proteína espicular de SARS-CoV-2 se recubre en cavidades de una microplaca de 96 cavidades al incubar durante la noche o durante hasta tres días. Luego se agrega amortiguador de bloqueo para bloquear los sitios de unión libres restantes. Las muestras de suero humano que contienen anticuerpos contra la proteína espicular de SARS-COV-2 y los controles del ensayo se agregan a la placa bloqueada y se incuban durante 1 hora. Durante la incubación, los anticuerpos anti-proteína espicular presentes en las muestras y en los controles positivos se unen a la proteína espicular inmovilizada en la placa. Luego las placas se lavan para eliminar los componentes del suero no unidos. Después, se agrega un anticuerpo anti-IgG humana etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para permitir la detección del anticuerpo unido a la proteína espicular. Después de una hora de incubación, las placas se lavan para eliminar el anticuerpo de detección con HRP no unido y se

agrega sustrato de TMB a las placas. En presencia de peroxidasa de rábano picante, el sustrato de TMB se torna azul intenso, de manera proporcional a la cantidad de HRP presente en la cavidad. Después de dejar que la reacción continúe durante aproximadamente 10 minutos, se agrega una solución de detención de base ácida, que detiene la reacción enzimática y torna el TMB color amarillo. El color amarillo es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-proteína espicular unidos en cada cavidad y se lee a 450 nm. La magnitud de la respuesta del ensayo se expresa en títulos. Los valores de título se definen como la mayor dilución en serie en la que la señal del ensayo es mayor que un valor de corte en función de los niveles basales del ensayo para un panel de suero de donantes humanos normales.

[0253] Calificación del método de ensayo ELISA

[0254] Se calificó el ensayo ELISA de la espícula de SARS-CoV-2 con INO-4800 y se lo consideró adecuado para el uso previsto para medir la respuesta humoral en sujetos que participan en ensayos clínicos que implican INO-4800. La calificación formal consistió en 18 placas y se llevó a cabo por dos operadores durante el curso de cuatro días. La calificación determinó la sensibilidad, especificidad, selectividad y precisión del ensayo. En el momento en el que se desarrolló el ensayo no estaban disponibles los sueros de convalecientes. Por lo tanto, se usó un anticuerpo monoclonal en el desarrollo. El anticuerpo monoclonal diluido en suero humano normal se usó para probar todos los parámetros en este ensayo. Se descubrió que la sensibilidad del ensayo en general fue de 16,1 ng/ml para suero diluido en 1/20, lo que es 322 ng/ml para suero no diluido. La especificidad se evaluó mediante la preincubación del anticuerpo anti-proteína espicular con proteína espicular recombinante antes del ensayo. La preincubación con la proteína espicular recombinante dio como resultado una reducción de señal mayor del 60 %, lo que indica que el anticuerpo se estaba uniendo específicamente a la proteína espicular recubierta hasta la placa y no a un componente del ensayo diferente. La selectividad se investigó al agregar muestras de suero humano individuales con anticuerpo anti-espícula de control positivo a una concentración cercana al límite de detección. Siete de cada diez individuos tuvieron la señal arriba del corte y ocho de cada diez individuos tuvieron la señal del ensayo dentro del 20 % de la señal media para los diez individuos, lo que demuestra que se espera que los efectos de matriz sean menores para la mayoría de las muestras de suero humano cuando se diluye en 1/20. La precisión del ensayo se evaluó al analizar un control positivo de anticuerpo anti-proteína espicular alto, bajo y medio seis veces en cada una de las seis placas. Los

resultados indicaron una variación de señal sin procesar intraensayo baja, pero una variación de señal sin procesar interensayo alta. Como cada corte de placa individual se basa en la señal de los controles negativos en cada placa, no se espera que la variación interensayo en la señal sin procesar afecte la precisión de los cálculos del título final. Para probar esto, la precisión de los cortes de placa se evaluó en esta calificación al titular el HPC (control positivo alto) seis veces en cada una de las seis placas en un total de treinta y seis evaluaciones de título. Treinta y cinco de los treinta y seis valores fueron idénticos (título de 180), mientras que una de las determinaciones de título estuvo una etapa por debajo del resto (60 en lugar de 180). Esto dio como resultado un CV interensayo de 4,6 %.

[0255] Ejemplo 5: Ensayo ELISPOT de la espícula del SARS-CoV-2 con INO-4800

[0256] El ensayo ImmunoSpot ligado a enzimas (ELISPOT) es un inmunoensayo altamente sensible que mide la frecuencia de células secretoras de citocinas al nivel de una única célula. En este ensayo, las células se cultivan en una superficie cubierta con un anticuerpo de captura específico en presencia o ausencia de estímulos. Después de un tiempo de incubación apropiado, las células se eliminan y la molécula secretada se detecta con un anticuerpo de detección en un procedimiento similar al empleado con ELISA. El anticuerpo de detección se biotinila, seguido de un conjugado de estreptavidina-enzima. Mediante el uso de un sustrato con un producto de precipitación más que uno soluble, el resultado final fueron puntos visibles en la superficie. Cada punto corresponde a una célula secretora de citocinas individual. La calificación del ensayo ELISPOT de IFN- γ se completó con éxito con una evaluación de especificidad, reproductibilidad y precisión del ensayo (precisión intraensayo y precisión interensayo), rango dinámico, linealidad, exactitud relativa, límite de detección y cuantificación y robustez del ensayo. El ensayo ha sido probado y calificado según las pautas de laboratorio GLP/GCLP.

[0257] Calificación del método de ensayo ELISPOT. Las lecturas de especificidad dieron un valor medio de <10 unidades de formación de puntos (SFU) para el control negativo del ensayo (medio con DMSO), una media de 565 SFU para el CEF del grupo de péptidos de control positivo y una media de 593 SFU en respuesta a estimulación con mitógeno (acetato de miristato de forbol + ionomicina). El % de CV más alto que se informó para la variación intraensayo fue 7,37 %. El % de CV más alto que se informó para la variación interensayo fue 17,23 %. El % de CV más alto que se observó para la variabilidad interoperador fue 8,11 %. Estos valores están por debajo

de los criterios de aceptación estándar recomendados por la FDA de 20 %.

[0258] La linealidad de la curva de dilución se demostró con una pendiente de 0,15 y un valor R² de 0,99. La exactitud del ensayo fue >90 % sobre el rango dinámico enumerado (156-5000 células/cavidad), que se encuentra dentro de los criterios de aceptación de 80-120 %. El límite de detección se determinó en 11 SFU/1x10⁶ PBMC, el límite de cuantificación se observó en 20 SFU/1x10⁶ PBMC. La robustez del ensayo se evaluó al variar (i) concentración de péptidos; (ii) concentración de anticuerpos secundarios; (iii) tiempos de incubación y (iv) secado de membranas de placa.

[0259] En función de los resultados de esta calificación, el ELISPOT de IFN- γ se considera calificado y listo para usar en ensayos clínicos.

[0260] Ejemplo 6: Estudio de etiqueta abierta de fase 1 para evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de INO-4800, una vacuna profiláctica contra SARS-CoV-2, administrada por vía intradérmica seguido de electroporación en voluntarios saludables [0261] Este es un ensayo

multicéntrico de etiqueta abierta de fase 1 (clinicaltrials.gov identificador NCT04336410) para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y el perfil inmunológico de INO-4800 (pGX9501) administrado por inyección intradérmica (ID) seguido de electroporación (EP) mediante el dispositivo CELLECTRA® 2000 en voluntarios adultos saludables. Aproximadamente 40 voluntarios saludables se evaluarán en dos (2) niveles de dosis: Grupo de estudio 1 y grupo de estudio 2, como se muestra en la Tabla 2. Un total de 20 sujetos se inscribirán en cada grupo de estudio.

[0262] Tabla 2: Grupos de dosis del estudio base de COVID19-001

Grupo de estudio	Cantidad de sujetos	Semanas de dosis	Cantidad de inyecciones + EP por cada visita de dosis	INO-4800 (mg) por inyección	INO-4800 (mg) por visita de dosis	Dosis total de INO-4800 (mg)
1	20	0, 4	1	1,0	1,0	2,0
2	20	0, 4	2 ^a	1,0	2,0	4,0
Total	40					

^aINO-4800 se inyectará por vía ID seguido de EP en una ubicación aceptable en dos extremidades diferentes en cada visita de dosis

[0263] Todos los sujetos se seguirán durante 24 semanas después de la última dosis. La semana 28 será la visita de final del estudio (EOS).

[0264] Objetivos primarios:

- Evaluar la tolerabilidad y seguridad del INO-4800 administrado por inyección ID seguido de EP en voluntarios adultos saludables
- Evaluar las respuestas inmunitarias celulares y humorales ante el INO-4800

administrado por inyección ID seguido de EP

[0265] Criterios de valoración de seguridad primarios:

- Incidencia de eventos adversos según la clase de órganos y sistemas (SOC), el término preferido (PT), la gravedad y la relación con el producto en investigación
- Reacciones en el sitio de administración (es decir, inyección) (descrito según frecuencia y gravedad)
- Incidencia de eventos adversos de especial interés

[0266] Criterios de valoración de inmunogenicidad primarios:

- Anticuerpos específicos de antígeno de la glucoproteína espicular de SARS-CoV-2 mediante ensayos de unión
- Respuesta inmunitaria celular específica de antígeno mediante ensayos de IFN- γ , ELISpot y/o citometría de flujo

[0267] Objetivo exploratorio:

- Evaluar el perfil inmunológico expandido al evaluar las respuestas inmunitarias de linfocitos T y B

[0268] Criterio de valoración exploratorio:

- El perfil inmunológico expandido que puede incluir (entre otros) evaluación adicional de cantidades de linfocitos T y B, respuesta de neutralización y cambios moleculares de linfocitos T y B al medir las proteínas inmunológicas y los niveles de mRNA de los genes de interés en todas las semanas como se determinó según la disponibilidad de muestras

[0269] Evaluación de seguridad:

[0270] Los sujetos se seguirán por seguridad durante la duración del ensayo hasta el final del estudio (EOS) o la última visita del sujeto. Los eventos adversos se recolectarán en cada visita (y una llamada del día 1). Las muestras de laboratorio de sangre y orina se extraerán en el cribado, día 0 (solo prueba de embarazo), semana 1, semana 4 (solo prueba de embarazo), semana 6, semana 8, semana 12 y semana 28, de acuerdo con el cronograma de eventos (Tabla 3). Todos los eventos adversos, independientemente de la relación, se recolectarán desde el momento de consenso hasta el EOS. Todos los eventos adversos graves, eventos adversos de especial interés y eventos adversos relacionados al tratamiento se seguirán hasta que se resuelvan o se estabilicen.

[0271] Tabla 3. Cronograma de eventos del ensayo clínico

Pruebas y evaluaciones	Cribado ^a	Día 0	Día 1 (+1d)	Semana 1 (± 3d)	Semana 4 (± 5d)	Semana 6 (± 5d)	Semana 8 (± 5d)	Semana 12 (± 5d)	Semana 28 (± 5d)
------------------------	----------------------	-------	-------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------

		Antes	Después			Antes	Después				
Consentimiento informado	X										
Criterios de inclusión/exclusión	X										
Antecedentes médicos	X	X									
Datos demográficos	X										
Medicamentos concomitantes	X	X			X	X		X	X	X	X
Examen físico ^b	X	X			X	X		X	X	X	X
Signos vitales	X	X			X	X		X	X	X	X
Altura y peso	X										
CBC con diferencial	X				X			X	X	X	X
Química ^c	X				X			X	X	X	X
Serología ^d	X										
ECG de 12 derivaciones	X										
Análisis de orina rutinario ^e	X				X			X	X	X	X
Prueba de embarazo ^f	X	X				X					
INO-4800 + EP ^g		Xh				Xh					
Datos de EP de descarga ⁱ			X				X				
Eventos adversos ^j	X	X	X	Xk	X	X	X	X	X	X	X
Inmunología (sangre entera) ^l	X	X				X		X	X	X	X
Inmunología (suero) ^m	X	X				X		X	X	X	X

Tabla 3 (cont.)

- La evaluación de cribado ocurre desde -30 días a -1 día anterior al día 0.
- La examinación física completa solo en el cribado y la semana 28 (o cualquier otra visita de discontinuación del estudio). Examen físico dirigido en todas las otras visitas.
- Incluye Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, glucosa, BUN y Cr.
- Anticuerpo contra VIH o prueba rápida, HBsAg, anticuerpo contra VHC.
- Tiras reactivas para glucosa, proteína y hematuria. Debe realizarse examinación microscópica si la tira reactiva es anormal.
- Prueba de embarazo en suero en el cribado. Prueba de embarazo en orina en otras visitas.
- Todas las dosis administradas por inyección intradérmica seguidas de EP.
- Para el grupo de estudio 1, una inyección en la piel, preferentemente sobre el músculo deltoides el día 0 y la semana 4. Para el grupo de estudio 2, dos inyecciones en la piel con cada inyección en un deltoides o cuádriceps

lateral diferente, preferentemente sobre el músculo deltoides, el día 0 y la semana 4.

i. Después de la administración de INO-4800, los datos de EP se descargarán del dispositivo CELLECTRA® 2000 y se proporcionarán a Inovio.

j. Incluye AE desde el momento de consenso y todas las reacciones del sitio de inyección que califican como un AE.

k. Llamada de seguimiento para recolectar los AE.

l. 4 x 8,5 ml (34 ml) de sangre entera en tubos de 10 ml de dextrosa de citrato ácido (ACD, superior amarillo) por punto temporal. Nota: Recolectar un total de 68 ml de sangre entera antes de la primera dosis (cribado y antes de la dosis del día 0).

m. 1 x 8 ml de sangre en un tubo de recolección de 10 ml de suero superior rojo por punto temporal. Nota: Recolectar cuatro alícuotas de 1 ml cada una (un total de 4 ml) de suero en cada punto temporal antes de la primera dosis (cribado y antes de la dosis del día 0).

[0272] Evaluación de la inmunogenicidad:

[0273] Las muestras de inmunología de sangre se extraerán en el cribado, día 0 (antes de la dosis), semana 4 (antes de la dosis), semana 6, semana 8, semana 12 y semana 28. La determinación del análisis de las muestras recolectadas para los criterios de valoración inmunológicos se determinarán de manera continua durante el estudio.

[0274] Población del ensayo clínico:

[0275] Voluntarios adultos sanos de entre 18 y 50 años, inclusive.

[0276] Criterios de inclusión:

- a. Adultos de 18 a 50 años, inclusive;
- b. Que el investigador los considere sanos según su historia clínica, exámenes físicos y signos vitales en el cribado;
- c. Ser capaces y estar dispuestos a cumplir con todos los procedimientos del estudio;
- d. Tener resultados de laboratorio en el cribado dentro de los límites normales o que el investigador considere que no son clínicamente significativos;
- e. Tener pruebas serológicas negativas en antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra la hepatitis C y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el cribado;
- f. Tener un electrocardiograma (ECG) en el cribado que el investigador considera que no arrojó hallazgos clínicamente significativos (por ejemplo, síndrome de Wolff-Parkinson-White);

g. Usar métodos anticonceptivos eficaces con una tasa de falla de <1 % por año cuando se utilizan de manera consistente y correcta desde el cribado hasta 3 meses después de la última dosis, estar en la menopausia, ser estéril por cirugía o estar en pareja con una persona estéril.

[0277] Criterios de exclusión:

a. Estar embarazada o amamantando, o tener la intención de quedar embarazada o concebir hijos dentro del plazo de duración previsto del ensayo que comienza con la visita de cribado hasta 3 meses después de la última dosis;

b. Está participando actualmente o ha participado en un estudio con un producto en investigación dentro de los 30 días anteriores al día 0;

c. Ha estado expuesto previamente al SARS-CoV-2 (prueba de laboratorio según el criterio del investigador) o haber recibido una vacuna de producto en investigación para la prevención de la COVID-19, el MERS o el SARS;

d. Tener actualmente o haber tenido las siguientes afecciones médicas:

- Enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica);
- Hipertensión, presión arterial sistólica en reposo >150 mm Hg o presión arterial diastólica >95 mm Hg;
- Neoplasia dentro de los 5 años del cribado;
- Enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía o arritmias clínicamente significativas);

e. Inmunosupresión como resultado de enfermedad subyacente o tratamiento que incluye:

- Inmunodeficiencias primarias;
- Uso a largo plazo (≥ 7 días) de glucocorticoides orales o parenterales;
- Uso actual o anticipado de dosis que modifican enfermedades de fármacos antirreumáticos y fármacos que modifican enfermedades biológicas;
- Antecedentes de trasplante de órgano sólido o médula ósea;
- Antecedentes de otra enfermedad inmunosupresora clínicamente significativa o enfermedad autoinmunitaria clínicamente diagnosticada.

f. Tener menos de dos sitios aceptables para la inyección ID y la EP, teniendo en cuenta el músculo deltoides y el cuádriceps anterolateral;

g. Cualquier hallazgo por examen físico y/o antecedentes de cualquier enfermedad que, según el investigador del estudio, podría alterar los resultados del

estudio o poner en riesgo adicional al paciente debido a su participación en el estudio.

[0278] Tratamiento del ensayo clínico: El producto farmacológico INO-4800 contiene 10 mg/ml del plásmido de ADN pGX9501 en 1X amortiguador SSC (cloruro de sodio 150 mM y citrato de sodio 15 mM). Un volumen de 0,4 ml se cargará en viales de vidrio de 2 ml que tienen tapones de caucho y tapas de aluminio selladas. INO-4800 se almacena a 2-8 °C.

[0279] Al grupo del estudio 1 se le inyecta por vía intradérmica (ID) 1,0 miligramo (mg) de INO-4800 seguido de electroporación (EP) mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 por visita de dosis el día 0 y la semana 4. Al grupo del estudio 2 se le administran dos inyecciones ID de 1,0 mg (total 2,0 mg por visita de dosis) (en un sitio aceptable en dos extremidades diferentes) de INO-4800 seguido de EP mediante el uso de dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y la semana 4.

[0280] Evaluaciones de inmunogenicidad de sangre periférica

[0281] Se obtienen muestras de sangre entera y suero. Las muestras de inmunología de sangre y suero se recolectan en el cribado y las visitas especificadas en el cronograma de eventos (Tabla 2). Las muestras de inmunología tanto del cribado como del día 0 se requieren para permitir todas las pruebas de inmunología. Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T y B a INO-4800 se miden mediante ensayos que incluyen, entre otros, ELISA, neutralización, evaluación de la expresión génica inmunológica, evaluación de la expresión de proteína inmunológica, citometría de flujo y ELISPOT. El ensayo de unión ELISA es un ELISA de placas estándar con placas de ELISA de 96 cavidades. Las placas se recubren con la proteína espicular de SARS-CoV-2 y se bloquean. Tras el bloqueo, los sueros de los sujetos vacunados se diluyen en serie y se incuban en la placa. Un anticuerpo secundario que es capaz de unirse a IgG humana se utiliza para evaluar el nivel de anticuerpos específicos de la vacuna en los sueros. La respuesta de los linfocitos T se evalúa mediante un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Las PBMC aisladas de los voluntarios del estudio se incuban con fragmentos peptídicos de la proteína espicular de SARS-CoV-2. Las células y los péptidos se colocan en placas MabTech recubiertas con un anticuerpo que captura IFN-gamma. Tras 24 horas de estimulación, las células se lavan, y se agrega un anticuerpo secundario que se une a IFN-gamma. Cada célula específica de la vacuna crea una mancha que se puede tener en cuenta a la hora de determinar el nivel de respuestas celulares inducidas. Además, las respuestas humores a la proteína de la nucleocápside (NP) del SARS-CoV-2 también se pueden evaluar para descartar cualquier posible infección por SARS-CoV-2 de tipo silvestre tras el tratamiento con

INO-4800 durante el estudio. La determinación del análisis de las muestras recolectadas para los criterios de valoración inmunológicos se determinan de manera continua durante el estudio.

[0282] Medición del resultado primario:

1. Porcentaje de participantes con eventos adversos (AE) [período de tiempo: Inicio hasta la semana 28]
2. Porcentaje de pacientes con reacciones en el sitio de administración (inyección) [período de tiempo: Día 0 hasta la semana 28]
3. Incidencia de eventos adversos de especial interés (AESI) [período de tiempo: Inicio hasta la semana 28]
4. Cambio desde el inicio en títulos de anticuerpos específicos contra el antígeno [período de tiempo: Inicio hasta la semana 28] Se considera que un sujeto tiene una respuesta de anticuerpos positivas si la densidad óptica después de la vacuna es 2,0 SD más alta que la densidad óptica el día 0 y mayor que el corte específico de ELISA.
5. Cambio desde el inicio en respuesta inmunitaria celular de interferón-gamma (IFN- γ) específica contra el antígeno [período de tiempo: Inicio hasta la semana 28] Se considera que un sujeto tiene una respuesta celular positiva si la cantidad de células productoras de IFN-gamma (manchas) después de la vacuna es 2,0 SD mayor que la cantidad de manchas el día 0 y mayor que el LOD del ensayo.

[0283] La seguridad de INO-4800 se mide y clasifica de acuerdo con la “Escala de clasificación de toxicidad para voluntarios adultos y adolescentes sanos inscritos en ensayos clínicos de vacunas preventivas” (*Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials*), emitida en septiembre de 2007 (anexo A). Un evento adverso de especial interés (AESI) (grave o no) es un problema científico y médico específico del producto o programa. Los AESI incluyen los enumerados en la Tabla 4.

[0284] Tabla 4.

Sistema corporal	AESI
Respiratorio	Síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS)
	Neumonitis/neumonía
Neurológico	Convulsión generalizada
	Meningitis aséptica
	Síndrome de Guillain-Barré (GBS)
	Encefalitis/mielitis
	Encefalomielitis diseminada aguda (ADEM)
Hematológico	Vasculopatía del SNC (apoplejía)
	Trombocitopenia
Inmunológico	Coagulación intravascular diseminada (DIC)
	Anafilaxia
	Vasculitis
Otro	Enfermedad mejorada tras la inmunización
	SAE locales/sistémicos
	Insuficiencia cardíaca aguda
	Insuficiencia renal aguda
	Síndrome de choque séptico

[0285] TOXICIDAD LIMITATIVA DE LA DOSIS (DLT)

[0286] A los fines de este ensayo clínico, las siguientes son toxicidades limitativas de la dosis:

- Eritema, hinchazón y/o induración en el sitio de inyección local de grado 3 o mayor observados ≥ 1 día después de la administración de INO-4800 (ver la Tabla 5);
- Dolor o sensibilidad en el sitio de inyección que requiere hospitalización a pesar del uso adecuado de analgésicos no narcóticos;
- Evento adverso no en el sitio de inyección de grado 4 o mayor evaluado por el PI como relacionado con la administración de INO-4800;
- Anomalías de laboratorio clínicamente significativas de grado 4 o mayor evaluadas por el PI como relacionadas con la administración de INO-4800.

[0287] Tabla 5. Escala de clasificación de reacciones en el sitio de inyección

Reacción local al producto inyectable (grado)	Leve (1)	Moderada (2)	Grave (3)	Potencialmente mortal (4)
Dolor	No interfiere con la actividad	Uso repetido de analgésico narcótico >24 horas o interfiere con la actividad	Cualquier uso de analgésico narcótico interfiere con la actividad diaria	Consulta en emergencias u hospitalización
Sensibilidad	Molestia leve al contacto	Molestia al moverse	Molestia significativa en reposo	Consulta en emergencias u hospitalización

Eritema/enrojecimiento ^a	2,5-5 cm	5,1-10 cm	>10 cm	Necrosis dermatitis exfoliativa ^o
Induración/hinchazón ^b	2,5-5 cm sin interferencia con la actividad	5,1-10 cm o interfiere con la actividad	>10 cm o interfiere con la actividad diaria	Necrosis

“Guía de la FDA para la Escala de clasificación de toxicidad para voluntarios adultos y adolescentes sanos inscritos en ensayos clínicos de vacunas preventivas” (*FDA Guidance for Industry-Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials*) de septiembre de 2007.

^a Además de clasificar la reacción local medida en el diámetro individual más grande, la medición debe registrarse como una variable continua

^b Debe evaluarse y clasificarse con la escala funcional, así como la medición real.

[0288] POBLACIONES ANALÍTICAS

[0289] Las poblaciones de análisis son las siguientes:

- La población con intención de tratar modificada (mITT) incluye a todos los sujetos que reciben al menos una dosis de INO-4800. Los sujetos en esta muestra se analizan según su grupo de dosis asignado de INO-4800. La población mITT se utiliza para analizar los criterios de valoración inmunológicos coprimarios y exploratorios.
- La población según el protocolo (PP) comprende sujetos mITT que reciben todas sus administraciones planificadas y que no tienen violaciones al protocolo importantes evaluadas por el monitor médico. Se considera que los análisis de la población PP respaldan los análisis de mITT correspondientes.

[0290] La población de análisis de seguridad incluye a todos los sujetos que reciben al menos una dosis de INO 4800 administrado mediante inyección ID. Los sujetos de esta población se agrupan de acuerdo con la dosis de INO-4800 que recibieron. Esta población se utiliza para todos los análisis de seguridad en el estudio.

[0291] ANÁLISIS DE SEGURIDAD PRIMARIOS

[0292] Los análisis primarios de este ensayo son análisis de seguridad de eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE), reacciones en el sitio de administración y cambios clínicamente significativos en los parámetros del laboratorio de seguridad con respecto al inicio.

[0293] Los TEAE se definen para este ensayo como cualquier evento adverso, evento adverso de especial interés o evento adverso grave que se produce el día 0 o después tras la administración IP. Todos los TEAE se resumen en función de la frecuencia, el porcentaje y el intervalo de confianza de 95 % de Clopper-Pearson asociado. Las frecuencias también se presentan por separado según el número de

dosis y se representan según la clase de orden del sistema y el término preferido. Las frecuencias adicionales se presentan con respecto a la gravedad máxima y la relación con IP. Múltiples AE iguales en un solo sujeto se cuentan solo una vez de acuerdo con un enfoque del peor caso con respecto a la gravedad y la relación con IP. Todos los TEAE graves se resumen como se indicó anteriormente. La duración del AE se calcula como la fecha en que terminó el AE – fecha de inicio del AE + 1 día. Los AE y SAE que no son TEAE ni TEAE graves se presentan en los listados.

[0294] Todos estos análisis de seguridad primarios se llevan a cabo en sujetos en la población de seguridad.

[0295] ANÁLISIS DE INMUNOGENICIDAD PRIMARIOS

[0296] Los títulos de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de la glucoproteína espicular de SARS-CoV-2 y las respuestas inmunitarias celulares específicas se analizan por grupo del estudio dentro de los estratos etarios. El título de los anticuerpos de unión se analiza para cada grupo del estudio mediante la media geométrica y los intervalos de confianza de 95 % asociados. Los aumentos en las respuestas inmunitarias celulares específicas contra el antígeno se analizan para cada grupo del estudio mediante las medianas, rango de intercuartiles e intervalos de confianza de 95 %. El cambio con respecto al inicio tanto del título de anticuerpos de unión como de los aumentos en las respuestas celulares específicas del antígeno se analizan mediante el aumento en veces de la media geométrica y los intervalos de confianza de 95 %. Los títulos de los anticuerpos de unión se analizan entre cada par de grupos del estudio dentro de los estratos etarios mediante la relación de media geométrica y los intervalos de confianza de 95 % asociados. Las respuestas inmunitarias celulares específicas contra el antígeno se analizan entre cada par de grupos del estudio dentro de los estratos etarios mediante la mediana de diferencias y los intervalos de confianza de 95 % asociados. Todos estos análisis de inmunogenicidad primarios se llevan a cabo en los sujetos en las poblaciones mITT y PP.

[0297] ANÁLISIS EXPLORATORIOS

[0298] La cantidad de linfocitos T y B después del inicio se analizará de manera descriptiva por grupo del estudio con medias/medianes e intervalos de confianza de 95 % asociados. El porcentaje de anticuerpos neutralizantes se analizará para cada grupo del estudio mediante las medianas, rango de intercuartiles e intervalos de confianza de 95 %.

[0299] La seguridad y la inmunogenicidad de la dosis de refuerzo opcional de INO-

4800 tras un régimen de dos dosis anterior se analizarán como se describe a continuación. El título de anticuerpos recíprocos neutralizantes vivos y el título de anticuerpos recíprocos pseudoneutralizantes se analizarán para cada grupo del estudio dentro de los estratos etarios mediante la media geométrica y los intervalos de confianza de 95 % asociados. El aumento en veces con respecto al inicio se tabulará para cada biomarcador inmunogénico. Si hay suficientes datos para el análisis, se llevará a cabo un análisis exploratorio entre comparaciones inmunogénicas de los grupos de los sujetos que eligieron solo 2 administraciones y los sujetos que eligieron 2 administraciones más la administración de refuerzo.

[0300] La exploración adicional del efecto de la edad y otros posibles factores de confusión sobre la relación entre los biomarcadores inmunitarios y la dosis de INO-4800 puede implicar el uso de modelos de regresión logísticos y/o ANCOVA.

[0301] RESULTADOS DEL ESTUDIO BASE PRELIMINAR

[0302] Los 8 eventos adversos informados fueron de grado 1; 5 se debieron a reacciones en el sitio de inyección local. No se informó ningún evento adverso, evento adverso de especial interés ni toxicidades limitativas de la dosis.

[0303] El análisis de ELISA de unión preliminar demostró que 7/9 (78 %) sujetos tuvieron respuestas de anticuerpos positivas. Los respondedores tuvieron un aumento de cuatro veces en el título.

[0304] En la semana seis, se llevaron a cabo múltiples ensayos de inmunología, incluso los que implicaban respuesta inmunitaria humoral y celular, para ambas cohortes de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg después de dos dosis. Los análisis en este punto mostraron que el 94 % (34 de cada 36 participantes del ensayo en total) demostró tasas de respuestas inmunológicas generales en función de datos preliminares que evalúan las respuestas inmunitarias humorales (de unión y neutralización) y de linfocitos T. Un participante en la cohorte de dosis de 1 mg y dos participantes en la cohorte de dosis de 2 mg se excluyeron del análisis inmunitarios porque dieron positivo en respuestas inmunitarias contra la COVID-19 al inicio del estudio, lo que indica que ya estuvieron infectados. Un participante en la cohorte de dosis de 2 mg dejó el estudio por razones no relacionadas con la seguridad ni con la tolerabilidad.

[0305] Hasta la semana ocho, INO-4800 fue generalmente seguro y fue bien tolerado en todos los participantes en ambas cohortes. Los diez eventos adversos (AE) informados fueron de gravedad de grado 1, y la mayoría fue enrojecimiento en el sitio de inyección. No se informaron eventos adversos graves (SAE).

[0306] RESULTADOS DE LA FASE I INICIAL

[0307] Datos demográficos de la población del estudio

[0308] Se cribó un total de 55 participantes y se inscribieron 40 participantes en los dos grupos iniciales (**Figura 16**). La mediana de edad fue de 34,5 años (rango de 18 a 50 años). 55 % de los participantes eran hombres (Tabla 6). La mayoría de los participantes eran caucásicos (82,5 %).

[0309] Tabla 6

Variable	Estadística	Grupo 1, 1 mg (N=20)	Grupo 2, 2 mg (N=20)	General (N=40)
Género				
Masculino	n (%)	11 (55,0)	11 (55,0)	22 (55,0)
Femenino	n (%)	9 (45,0)	9 (45,0)	18 (45,0)
Raza				
Caucásica	n (%)	18 (90,0)	15 (75,0)	33 (82,5)
Negra o afroamericana	n (%)	1 (5,0)	1 (5,0)	2 (5,0)
Asiática	n (%)	1 (5,0)	4 (20,0)	5 (12,5)
Etnia				
Hispanica o latina	n (%)	0	0	0
No hispanica o latina	n (%)	20 (100,0)	20 (100,0)	40 (100,0)
Edad (años)	n	20	20	40
	Media (SD)	35,0 (10,69)	35,6 (9,18)	35,3 (9,84)
	Mediana	33,0	38,0	34,5
	Mín, Máx	18, 50	19, 50	18, 50
Altura inicial (cm)	n	20	19	39
	Media (SD)	172,59 (10,853)	172,16 (8,631)	172,38 (9,707)
	Mediana	169,75	170,10	170,10
	Mín, Máx	155,9, 195,6	158,0, 188,0	155,9, 195,6
Peso inicial (kg)	n	20	19	39
	Media (SD)	74,13 (14,701)	71,35 (12,611)	72,77 (13,615)
	Mediana	70,45	69,00	69,60
	Mín, Máx	58,5, 110,0	55,0, 92,5	55,0, 110,0

[0310] La vacuna se administró en inyecciones intradérmicas de 0,1 ml seguidas de EP en el sitio de vacunación. Se llevó a cabo una EP mediante CELLECTRA® 2000 con cuatro pulsos de 52 ms a 0,2A (de 40 a 200 V, según la resistencia del tejido) por temporada. Los dos primeros pulsos tuvieron una diferencia de 0,2 segundos, seguidos de una pausa de 3 segundos antes de los dos pulsos finales, también separados por 0,2 segundos. Los grupos de dosis se inscribieron secuencialmente con una prueba de seguridad para cada uno. Los participantes se

evaluaron y se evaluarán clínicamente y por seguridad el día 1 y las semanas 1, 4 (dosis 2), 6, 8, 12, 28, 40 y 52. Las pruebas de laboratorio de seguridad (recuento sanguíneo completo, panel metabólico completo y uroanálisis) se realizaron y se realizarán en todas las visitas de seguimiento, excepto en el día 0, el día 1 y la semana 4. Se obtuvieron muestras de inmunología en todos los puntos temporales después de la dosis 1, excepto el día 1 y la semana 1. El investigador registró y clasificó los AE locales y sistémicos, independientemente de su relación con la vacuna. Los AE se clasificaron de acuerdo con las guías para la Escala de clasificación de toxicidad para voluntarios adultos y adolescentes sanos inscritos en ensayos clínicos de vacunas preventivas (*Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials*), emitidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos en septiembre de 2007.

[0311] Seguridad y tolerabilidad de la vacuna

[0312] 39 (97,5 %) completaron ambas dosis, y 1 sujeto en el grupo de 2,0 mg dejó de participar en el ensayo antes de recibir la segunda dosis debido a la falta de transporte a los sitios clínicos, causa no relacionada con el estudio ni con las dosis. Todos los 39 sujetos restantes completaron la visita 8 semanas después de la dosis 1. Hubo un total de 11 AE locales y sistémicos informados a las 8 semanas después de la dosis 1, seis de los cuales se relacionaron con la vacuna. Todos los AE fueron leves o de grado 1. Los AE más frecuentes fueron reacciones en el sitio de inyección, incluso dolor en el sitio de inyección (3) y eritema (2). Un AE sistémico relacionado con la vacuna fueron náuseas. No hubo reacciones febriles. Ningún sujeto dejó el ensayo debido a un AE. No se informaron eventos adversos graves (SAE) ni AESI. No hubo valores de laboratorio anormales clínicamente preocupantes durante el período de seguimiento inicial de 8 semanas. No hubo un aumento en la cantidad de participantes que experimentaron AE relacionados con la vacuna en el grupo de 2,0 mg (10 % de los sujetos), en comparación con la del grupo de 1,0 mg (15 % de los sujetos). Además, no hubo un aumento en las frecuencias de AE con la segunda dosis en comparación con la primera dosis en ambos grupos de niveles de dosis. Por lo tanto, los datos de seguridad de la fase 1 de INO-4800 sugieren que la vacuna es probablemente un refuerzo seguro, ya que no hubo un aumento en la frecuencia de efectos secundarios después de la segunda administración de la vacuna en comparación con la primera dosis.

[0313] Inmunogenicidad: Se incluyeron a treinta y ocho sujetos en el análisis de inmunogenicidad. Además de un sujeto en el grupo de 2,0 mg que abandonó el

estudio antes de completar la dosificación, un sujeto en el grupo de 1,0 mg se consideró seropositivo al inicio y, por ende, se excluyó.

[0314] Respuestas inmunitarias humores: Se usaron muestras de suero para medir los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la cepa aislada SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 y anticuerpos de unión contra RBD y la proteína espicular S1+S2 entera.

[0315] Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de S1+S2: Un ELISA de unión estándar se utilizó para detectar anticuerpos de unión contra la proteína espicular de anti-SARS-CoV-2 en suero. Se recubrieron placas de ELISA con proteína espicular de SARS-CoV-2 S1+S2 recombinante (Sino Biological), las cuales se incubaron durante la noche y se bloquearon. Las muestras se diluyeron en serie y se incubaron en las placas de ensayo bloqueadas durante una hora. La magnitud de la respuesta del ensayo se expresó como títulos, que se definieron como la mayor dilución en serie a la cual la densidad óptica 3 SD por encima del fondo el día 0. El 68 % de los participantes en el grupo de 1,0 mg y el 70 % de los participantes en el grupo de 2,0 mg tuvieron al menos un aumento en los títulos de unión a IgG contra la proteína espicular S1+S2 en comparación con su punto temporal antes de la vacunación (día 0), con la GMT de respuesta de 320,0 (95 % de CI: 160,5, 638,1) y 508,0 (95 % de CI: 243,6, 1059,4) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente (Figura 17C). En la Figura 17D, se evaluó la respuesta humoral en el grupo de dosis de 1,0 mg y el grupo de dosis de 2,0 mg para determinar la capacidad de unión a la proteína espicular entera (S1 y S2) (n=19, 1,0 mg; n=19, 2,0 mg). Los títulos de valoración se calcularon como el título que exhibía una SD OD 3,0 por encima del valor inicial, los títulos al inicio se establecieron en 1. Una respuesta a la neutralización de virus vivo fue una IC50 en PRNT ≥ 10 . En todos los gráficos, las líneas horizontales representan la mediana y las barras representan el rango intercuartílico.

[0316] Los sueros también se evaluaron para determinar su capacidad para neutralizar virus vivo en ensayos de neutralización del virus SARS-CoV-2 de tipo silvestre. Los ensayos de neutralización de la cepa aislada SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 se realizaron en Public Health England (Porton Down, Reino Unido). Los títulos de virus neutralizantes se midieron en las muestras de suero que se habían inactivado con calor a 56 °C durante 30 minutos. El SARS-CoV-2 (cepa aislada 44 Australia/VIC01/2020) se diluyó hasta una concentración de 933 pfu ml⁻¹ y se mezcló 50:50 en 1 % de FCS/MEM que contenía amortiguador HEPES 25 mM con dobles diluciones de suero. Después de 5 días de incubación a 37 °C en una caja

humidificada, las placas se fijaron y se tiñeron, y se contaron las placas. Los títulos del virus se determinaron con el uso de un ensayo de 50 % de dosis de infección en cultivo tisular (TCID₅₀) estándar. Después de la segunda vacunación en la semana 6, la media geométrica de título (GMT) de respuesta mediante el ensayo de neutralización de IC₅₀ en PRNT de virus vivo fue de 82,4 y 63,5 en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. El porcentaje de respondedores (IC₅₀ en PRNT después de la vacunación ≥ 10) fueron de 83 % y 84 % en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente (**Figura 17A** y Tabla 7).

[0317]

Tabla 7. Neutralización de SARS-CoV-2 vivo		
	1,0 mg N=18*	2,0 mg N=19
General	44,4 (14,6,	
Rango de título recíproco GMT en la semana 6 (95 % de CI)	134,8)	34,9 (15,8, 77,2)
Respondedores** n (%)	1, 11647	1, 652
	<u>15 (83 %)</u>	<u>16 (84 %)</u>
Rango de título recíproco GMT en la semana 6 (95 % de CI)	82,4 (29,1,	63,5 (39,6, 101,8)
	233,3)	13, 652
	4, 11647	

* Excluye a un sujeto con NP positiva mediante ELISA al inicio

** IC₅₀ en PRNT en la semana 6 ≥ 10 , o ≥ 4 si se observa actividad de unión en ELISA

[0318] Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de RBD: Se recubrieron placas MaxiSorp de 96 cavidades (ThermoFisher, 439454) con 50 ul/cavidad de 1 ug/ml de RBD de SARS-CoV-2 (SinoBiological, 40592-V08H), y la proteína se diluyó en PBS y se incubó a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron 4 veces con PBST (PBS con 0,05 % de Tween-20) y se bloquearon con 200 ul/cavidad de amortiguador de bloqueo (PBS con leche en polvo descremada al 5 % y 0,1 % de Tween-20) a temperatura ambiente durante 2 h. Después del lavado con PBST, 50 ul/cavidad de muestra de sueros diluidos en serie en amortiguador de bloqueo se agregaron a la placa por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Después del lavado con PBST, 50 ul/cavidad de anticuerpo de detección anti-IgG humana-HRP (BD Pharmingen, 555788) diluido 500 veces en amortiguador de bloqueo se agregaron en incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado con PBST, 50 ul/cavidad de 1-Step Ultra TMB (Thermo, 34028) se agregaron en incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 50 ul/cavidad de ácido sulfúrico 2 M para detener la reacción de cambio de color, y la absorbancia óptica se midió a 450 y 570 nm en un lector de microplacas Synergy 2 (Biotek). Los títulos de valoración se definieron como la mayor dilución en serie a la cual los valores de OD₄₅₀₋₅₇₀ fueron 3 desviaciones estándar por encima de la señal compatible del

día 0. En la semana 6, la GMT de respuesta fue de 385,6 (95 % de CI: 69,0, 2154,9) y 222,1 (95 % de CI: 87,0, 566,8) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente (**Figura 17B**).

[0319] La seroconversión general (definida como aquellos participantes que respondieron con anticuerpos de neutralización o unión contra la proteína S o el RBD) después de 2 dosis de la vacuna en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg fue de 89 % y 95 %, respectivamente.

[0320] Respuestas celulares: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre, y se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido para análisis futuros.

[0321] *ELISPOT de la proteína espicular de SARS-CoV-2 con INO-4800.* Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después de la vacunación. Las células se estimularon *in vitro* con un grupo de péptidos 15-meros (superpuestos por 9 residuos) que abarcaban la secuencia de la proteína espicular de consenso de longitud completa. Las células se incubaron durante la noche (18-22 h, 37C, 5 % de CO₂) con grupos de péptidos (225 µg/ml), DMSO solo (0,5 %, control negativo) o PMA y ionomicina (controles positivos). Al día siguiente, las células se lavaron, y las placas se desarrollaron. El anticuerpo de detección se biotinila, seguido de un conjugado de estreptavidina-enzima. Mediante el uso de un sustrato con un producto de precipitación más que uno soluble, se obtuvieron manchas visibles. Cada mancha corresponde a una célula secretora de citocinas individual. Una vez desarrolladas las placas, las manchas se barrieron y cuantificaron mediante el uso del microanalizador CTL S6 (CTL) con *software* ImmunoCapture™ e ImmunoSpot™. Los valores se muestran como el promedio con fondo restado de los triplicados medidos.

[0322] El porcentaje de respondedores en la semana 8 fue del 74 % en el grupo de dosis de 1,0 mg y 100 % en el grupo de dosis de 2,0 mg (Tabla 8). La mediana de SFU por 10⁶ PBMC fue de 46 y 71 para los respondedores en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. En cada grupo, hubo aumentos estadísticamente significativos en las cantidades de células secretoras de interferón γ (SFU) obtenidos por millón de PBMC con respecto al inicio (P=0,001 y P<0,0001, respectivamente, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*), Figura 18A. Curiosamente, 5 no respondedores en el grupo de 1,0 mg mediante el ensayo ELISpot de linfocitos T mostraron una reactividad fuerte mediante el ensayo de neutralización de virus vivo. También cabe destacar que 3 muestras de convalecientes evaluadas mediante el ensayo ELISpot mostraron respuestas de linfocitos T más

bajas, con una mediana de 33, que el grupo de dosis de 2,0 mg en la semana 8. INO-4800 generó fuertes respuestas de linfocitos T que fueron más frecuentes y una mediana de respuesta de los respondedores más alta (45,6 en comparación con 71,1) en el grupo de dosis de 2,0 mg. Las respuestas de linfocitos T del grupo de 2,0 mg se mapearon con respecto a 5 agrupaciones de epítomos como se muestra en la Figura 18B. Curiosamente, se observaron respuestas de linfocitos T en todas las regiones de la proteína espicular.

[0323] Tabla 8. Respuestas inmunitarias

Ensayo de inmunidad	Cohorte de 1,0 mg		Cohorte de 2,0 mg	
	Valor resultante	Respondedores [‡] n (%)	Valor resultante	Respondedores [‡] n (%)
Neutralización GMT en la semana 6 Título recíproco [95 % de CI] (Rango)	44,4 [14,6, 134,8] (1, 11647)	15/18 (83 %)	34,9 [15,8, 77,2] (1, 652)	16/19 (84 %)
Unión a RBD Anticuerpo en la semana 6 GMT recíproca [95 % de CI] (Rango)	27,3 [4,8, 156,8] (1, 15625)	10/18 (56 %)	66,8 [17,4, 257,5] (1, 3125)	14/18 (78 %)
Unión a S1+S2 Anticuerpo en la semana 6 GMT recíproca [95 % de CI] (Rango)	174,4 [59,9, 507,3] (1, 2560)	17/19 (89 %)	136,8 [34,5, 543,1] (1, 2560)	15/19 (79 %)
IFN-gamma ELISpot en la semana 8 Mediana de SFU por [95 % de CI] (Rango)	26,2 SFU [10-64] (1, 374,4)	14/19 (74 %) ^μ	71 SFU [32-194] (8,9, 615,6)	19/19 (100 %) ^μ

La cohorte de 1,0 mg excluye a un sujeto con título inicial mediante ELISA de 1280

[‡] Criterios de respuesta: Neutralización: IC₅₀ en PRNT en la semana 6 ≥10, o ≥4 si se observa actividad de unión en ELISA; unión a RBD: valor en la semana 6 >1 ELISpot – valor ≥12 SFU con respecto a la semana 0

^μ - Respondedores generados mediante el uso de los datos de la semana 6 y la semana 8

[0324] Ensayo por citometría de flujo de la proteína espicular de SARS-CoV-2 con INO-4800: La contribución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ a la respuesta inmunitaria

celular contra INO-4800 se evaluó mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS). También se usaron PBMC para el análisis por tinción de citocinas intracelulares (ICS) mediante citometría de flujo. Un millón de PMBC en 200 μ l de medios RPMI completos se estimularon durante seis horas (37 °C, 5 % de CO₂) con DMSO (control negativo), PMA y ionomicina (control positivo, 100 ng/ml y 2 μ g/ml, respectivamente), o con los grupos de péptidos indicados (225 μ g/ml). Una hora después de la estimulación, se agregaron brefeldina A y monensina (BD GolgiStop y GolgiPlug, 0,001 % y 0,0015 %, respectivamente) para bloquear la secreción de las citocinas expresadas. Después de la estimulación, las células se movieron a 4 °C durante la noche. A continuación, las células se lavaron en PBS para la tinción Live/Dead (tinte de viabilidad fijable de Live/Dead aqua de Life Technologies, como se describió anteriormente) y luego se volvieron a suspender en amortiguador FACS (0,5 % de BSA, EDTA 2 mM, HEPES 20 mM). Luego, las células se tiñeron para detectar marcadores extracelulares, se fijaron y se permeabilizaron, y luego se tiñeron para detectar las citocinas indicadas (Tabla 9) con respecto a los anticuerpos utilizados para la citometría de flujo.

[0325] Tabla 9: Panel de citometría de flujo

Tubo	Canal	Marcador/citocina
1	Sin teñir	NA
2	BV510	Live/Dead Fix Aqua
3	BUV737	CD8
4	APC-Cy7	IL-2
5	BV650	CD45RA
6	APC	CD3
7	BV786	CD14/CD16/CD19
8	BV711	IFN-gamma
9	BV421	CCR7
10	PE-Cy7	IL-17
11	FITC	FITC
12	PE Dazzle (PE-CF594)	IL-4
13	PE	CD107a
14	PerCP-eFluor710 (PerCP-Cy5,5)	CD4

[0326] Los linfocitos T CD8⁺ que producen IFN- γ , TNF- α y/o IL-2 (cualquier respuesta) aumentaron de manera estadísticamente significativa después de la vacunación en el grupo de dosis de 2,0 mg (**Figura 18C**, P=0,0181, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*). Los linfocitos T CD4⁺ que producen TNF- α también aumentaron de manera estadísticamente significativa en el grupo de dosis de 2,0 mg (**Figura 18C**, P=0,0020, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*).

[0327] Los linfocitos T CD4+ y CD8+ se exploraron tras la vacunación. Casi la mitad (47 %) de los linfocitos T CD8+ en el grupo de dosis de 2,0 mg producían tanto IFN- γ como TNF- α (**Figura 18E**). Los linfocitos T CD8+ que producen citocinas en el grupo de dosis de 1,0 mg fueron células productoras de IFN- γ principalmente monofuncionales. El compartimento de linfocitos T CD4+ fue altamente polifuncional, en donde el 6 % y el 9 % (en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente) producían las 3 citocinas, IFN- γ , TNF- α e IL-2.

[0328] La composición de linfocitos T CD4+ o CD8+ que producen cualquier citocina (cualquier respuesta, IFN- γ , TNF- α o IL-2 tras la vacunación) también se evaluó para detectar los marcadores superficiales CCR7 y CD45RA con el fin de caracterizar las células efectoras (CCR7-CD45RA+), de memoria efectoras (CCR7-CD45RA-) y de memoria central (CCR7+CD45RA-) (**Figura 18D**). En ambos grupos de dosis, los linfocitos T CD8+ que producen citocinas en respuesta a la estimulación con péptidos de la espícula se balancearon en las tres poblaciones, mientras que los linfocitos T CD4+ fueron predominantemente del fenotipo de memoria central (**Figura 18D**).

[0329] Las respuestas de Th2 también se midieron al evaluar la producción de IL-4, y no se observaron aumentos estadísticamente significativos (prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*) en ninguno de los grupos después de la vacunación (**Figura 18F**).

[0330] En este ensayo de fase 1, la vacunación con INO-4800 produjo respuestas potentes de linfocitos T con fenotipo de Th1 aumentado, lo cual se demostró tanto mediante ELISpot de IFN- γ como por citometría de flujo multiparamétrica, evidenciado por una mayor expresión de las citocinas de tipo Th1 IFN- γ , TNF- α e IL-2 (**Figura 18C**). La evaluación de la polifuncionalidad de los linfocitos T inducida por INO-4800 sugirió la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra el SARS-CoV-2 que exhibían características de estado de memoria, lo cual sugiere que se estableció una respuesta celular persistente (Figura 18D). Es importante destacar que esto se logró mientras se minimizaba la inducción de IL-4, una citocina de Th2 prototípica (**Figura 18F**).

[0331] ACTUALIZACIÓN DE LA FASE 1

[0332] Se diseñó como un ensayo multicéntrico de etiqueta abierta de fase 1 (NCT04336410) para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de INO-4800 administrado por vía intradérmica (ID) seguido de electroporación mediante el dispositivo CELLECTRA 2000. Los participantes sanos de 18 a 50 años sin

antecedentes conocidos de la enfermedad COVID-19 recibieron una dosis de 1,0 mg o 2,0 mg de INO-4800 en un régimen de 2 dosis (semanas 0 y 4).

[0333] Vacuna de ADN INO-4800. La vacuna se produjo de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación actuales. INO-4800 contiene el plásmido pGX9501 que expresa una secuencia optimizada y sintética de la glucoproteína espicular de longitud completa del SARS-CoV-2, que se optimizó como se describió anteriormente a una concentración de 10 mg/ml en un amortiguador de solución salina y citrato de sodio.

[0334] Criterios de valoración. Los criterios de valoración de seguridad incluyeron reacciones sistémicas y locales en el sitio de administración hasta 8 semanas después de la dosis 1. Los criterios de valoración de inmunología incluyen títulos de anticuerpos de unión específica a antígenos, títulos de neutralización y respuestas inmunitarias celulares de interferón-gamma (IFN-g) específicas contra antígenos después de 2 dosis de la vacuna. Para la neutralización del virus vivo, un respondedor se define como una IC₅₀ en PRNT en la semana 6 >10, o >4 si un sujeto es un respondedor en ELISA. Para ELISA de S1+S2, un respondedor se define como un valor en la semana 6 >1. Para el ensayo ELISpot, un respondedor se define como un valor en la semana 6 o la semana 8 que es >12 unidades formadoras de manchas de por 10⁶ PBMC por encima de la semana 0.

[0335] Procedimientos del estudio.

[0336] Cuarenta participantes se inscribieron en dos grupos; 20 participantes en cada uno de los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg que recibieron sus dosis en las semanas 0 y 4. La vacuna se administró en inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en el brazo seguidas de EP en el sitio de vacunación. Los sujetos en el grupo de dosis de 1,0 mg recibieron una inyección en cada visita de dosis. La segunda dosis de la vacuna se inyectó en el mismo brazo o en el otro brazo en comparación con la primera dosis. Los sujetos en el grupo de dosis de 2,0 mg recibieron una inyección en cada brazo en cada visita de dosis. Se realizó EP con CELLECTRA® 2000 como se describió anteriormente. El dispositivo administra cuatro pulsos eléctricos en total, cada 52 ms de duración en concentraciones de corriente de 0,2 A y tensión de 40-200 V por pulso. Los grupos de dosis se inscribieron secuencialmente con una prueba de seguridad para cada uno. En el grupo de dosis de 1,0 mg se inscribió un solo participante por día durante 3 días. Un Comité de Monitoreo de Datos y de Seguridad (DSMB) independiente revisó los datos de seguridad de la semana 1 y, en función de una evaluación de seguridad favorable, recomendó completar la inscripción de los 17

participantes adicionales en ese grupo de dosis. De manera similar, el grupo de dosis de 2,0 mg se inscribió posteriormente. Se evaluaron la seguridad y los medicamentos concomitantes de los participantes en todos los puntos temporales, incluso en el cribado, la semana 0 (dosis 1), después de la dosis, al día siguiente por teléfono y las semanas 1, 4 (dosis 2), 6, 8, 12, 28, 40 y 52 después de la dosis 1. El investigador registró y clasificó los AE locales y sistémicos, independientemente de su relación con la vacuna. Las pruebas de laboratorio de seguridad (recuento sanguíneo completo, panel metabólico completo y uroanálisis) se realizaron y se realizarán en el cribado y en las semanas 1, 6, 8, 12, 28 y 52 después de la dosis 1. Se obtuvieron muestras de inmunología en todos los puntos temporales después de la dosis 1, excepto el día 1 y la semana 1. Los AE se clasificaron de acuerdo con las guías para la Escala de clasificación de toxicidad para voluntarios adultos y adolescentes sanos inscritos en ensayos clínicos de vacunas preventivas (*Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials*), emitidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos en septiembre de 2007. Los datos de laboratorio y de AE revisados por el DSMB de los participantes hasta 8 semanas se incluyeron en este informe. Fueron normas de interrupción de seguridad especificadas por el protocolo y eventos adversos de especial interés (AESI). A los fines de este informe, se presentan las evaluaciones de seguridad de laboratorio y clínicas hasta 8 semanas después de la primera dosis.

[0337] Elegibilidad para el protocolo. Los participantes elegibles deben cumplir con los siguientes criterios: ser adultos sanos de entre 18 y 50 años; ser capaces y estar dispuestos a cumplir con todos los procedimientos del estudio; tener un índice de masa corporal de 18-30 kg/m² en el cribado; tener pruebas serológicas negativas en antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos contra la hepatitis C y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana; tener un electrocardiograma (ECG) en el cribado que el investigador considera que no arrojó hallazgos clínicamente significativos; usar métodos anticonceptivos eficaces con una tasa de falla de <1 % por año cuando se utilizan de manera consistente, estar en la menopausia, ser estéril por cirugía o estar en pareja con una persona estéril. Los criterios de exclusión clave incluyeron los siguientes: individuos cuyo trabajo actual los pone en un riesgo alto de exposición al SARS-CoV-2; exposición previa conocida al SARS-CoV-2 o haber recibido un producto en investigación para la prevención o el tratamiento de la COVID-19; autoinmunosupresión o inmunosupresión como resultado de enfermedad subyacente o tratamiento; hipersensibilidad o reacciones alérgicas graves a vacunas o

fármacos; afecciones médicas que aumentan el riesgo de padecer COVID-19 grave; tabaquismo, vapeo, o dependencia o abuso activo de drogas, alcohol o sustancias; y tener menos de dos sitios aceptables disponibles para la inyección intradérmica y la electroporación.

[0338] Población del ensayo clínico:

[0339] Voluntarios adultos sanos de entre 18 y 50 años, inclusive.

[0340] Criterios de inclusión:

- a. Adultos de 18 a 50 años, inclusive;
- b. Que el investigador los considere sanos según su historia clínica, exámenes físicos y signos vitales en el cribado;
- c. Ser capaces y estar dispuestos a cumplir con todos los procedimientos del estudio
- d. Tener resultados de laboratorio en el cribado dentro de los límites normales o que el investigador considere que no son clínicamente significativos;
- e. Tener pruebas serológicas negativas en antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra la hepatitis C y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el cribado;
- f. Tener un electrocardiograma (ECG) en el cribado que el investigador considera que no arrojó hallazgos clínicamente significativos (por ejemplo, síndrome de Wolff-Parkinson-White);
- g. Usar métodos anticonceptivos eficaces con una tasa de falla de <1 % por año cuando se utilizan de manera consistente y correcta desde el cribado hasta 3 meses después de la última dosis, estar en la menopausia, ser estéril por cirugía o estar en pareja con una persona estéril.

[0341] Criterios de exclusión:

- a. Estar embarazada o amamantando, o tener la intención de quedar embarazada o concebir hijos dentro del plazo de duración previsto del ensayo que comienza con la visita de cribado hasta 3 meses después de la última dosis;
- b. Está participando actualmente o ha participado en un estudio con un producto en investigación dentro de los 30 días anteriores al día 0;
- c. Ha estado expuesto previamente al SARS-CoV-2 (prueba de laboratorio según el criterio del investigador) o haber recibido una vacuna de producto en investigación para la prevención de la COVID-19, el MERS o el SARS;
- d. Tener actualmente o haber tenido las siguientes afecciones médicas:
 - Enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma, enfermedad

pulmonar obstructiva crónica);

- Hipertensión, presión arterial sistólica en reposo >150 mm Hg o presión arterial diastólica >95 mm Hg;
- Neoplasia dentro de los 5 años del cribado;
- Enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía o arritmias clínicamente significativas);

e. Inmunosupresión como resultado de enfermedad subyacente o tratamiento que incluye:

- Inmunodeficiencias primarias;
- Uso a largo plazo (≥ 7 días) de glucocorticoides orales o parenterales;
- Uso actual o anticipado de dosis que modifican enfermedades de fármacos antirreumáticos y fármacos que modifican enfermedades biológicas;
- Antecedentes de trasplante de órgano sólido o médula ósea;
- Antecedentes de otra enfermedad inmunosupresora clínicamente significativa o enfermedad autoinmunitaria clínicamente diagnosticada.

f. Tener menos de dos sitios aceptables para la inyección ID y la EP, teniendo en cuenta el músculo deltoide y el cuádriceps anterolateral;

g. Cualquier hallazgo por examen físico y/o antecedentes de cualquier enfermedad que, según el investigador del estudio, podría alterar los resultados del estudio o poner en riesgo adicional al paciente debido a su participación en el estudio.

[0342] Métodos de evaluación de la inmunogenicidad.

[0343] Las muestras recolectadas en el cribado, la semana 0 (antes de la dosis) y las semanas 6 y 8 se analizaron. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre mediante un recubrimiento estándar en Ficoll-Hypaque, seguido de centrifugación. Las células aisladas se congelaron en 10 % de DMSO y 90 % de suero de ternero fetal. Las PBMC congeladas se almacenaron en nitrógeno líquido para análisis futuros. Las muestras de suero se almacenaron a -80 °C hasta su uso para medir los títulos de anticuerpos de unión y neutralizantes.

[0344] Ensayos de neutralización del virus SARS-CoV-2 de tipo silvestre.

[0345] Los ensayos de neutralización de la cepa aislada SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 se realizaron en Public Health England (Porton Down, Reino Unido). Los títulos de virus neutralizantes se midieron en las muestras de suero que se habían inactivado con calor a 56 °C durante 30 minutos. El SARS-CoV-2 (cepa aislada 44 Australia/VIC01/2020) se diluyó hasta una concentración de 933 pfu/ml y se

mezcló 50:50 en 1 % de FCS/MEM que contenía amortiguador HEPES 25 mM con dobles diluciones de suero.

Después de 1 h de incubación a 37 °C, la mezcla de virus-anticuerpo se transfirió a monocapas confluentes de células Vero E6 (ECACC 85020206; PHE, Reino Unido). El virus se dejó adsorber en las células a 37 °C durante una hora adicional en una incubadora, y la monocapa celular se recubrió con MEM/4 % de FBS/1,5 % de CMC. Después de 5 días de incubación a 37 °C, las placas se fijaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,2 % (Sigma) en 25 % de metanol (v/v). Las placas se contaron.

[0346] Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de S1+S2.

[0347] Las placas de ELISA se recubrieron con 2,0 mg/ml de proteína espicular S1+S2 del SARS-CoV-2 recombinante (Acro Biosystems; SPN-C52H8) y se incubaron durante la noche a 2-8 °C. La S1+S2 contiene los residuos de aminoácidos Val 16-Pro 1213 de la proteína espicular de longitud completa, GenBank N.º QHD43416.1. Contiene dos mutaciones para estabilizar la proteína hasta el estado trimérico previo a la fusión (R683A, R685A) y también contiene una etiqueta 10xHis del terminal C (SEQ ID NO: 24). Luego, las placas se lavaron con PBS con 0,05 % de Tween-20 (Sigma; P3563) y se bloquearon (StartingBlock, Thermo Scientific; 37.538) durante 1-3 h a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron en serie con amortiguador de bloqueo y se agregaron por duplicado, junto con los controles preparados, a las placas de ensayo lavadas y bloqueadas. Las muestras se incubaron en las placas de ensayo bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación de las muestras y los controles, las placas se lavaron y, luego, se agregó una preparación 1/1000 de conjugado de HRP anti-IgG humana (BD Pharmingen; 555.788) en amortiguador de bloqueo a cada cavidad y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y, luego, el sustrato de TMB (KPL; 5120-0077) se agregó y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min. Luego, se agregó solución de detención de TMB (KPL; 5150-0021), y las placas se leyeron a 450 nm y 650 nm en un lector de microplacas Synergy HTX (BioTek). La magnitud de la respuesta del ensayo se expresó como títulos, que se definieron como el mayor factor de dilución recíproca de la mayor dilución en serie a la cual la densidad óptica corregida por la placa es 3 SD por encima del fondo de un sujeto correspondiente a la semana 0.

[0348] Ensayo ELISPOT de la proteína espicular de SARS-CoV-2.

[0349] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después

de la vacunación se estimularon *in vitro* con péptidos 15-meros (superpuestos por 9 residuos) que abarcaban la secuencia de consenso de la proteína espicular de longitud completa. Las células se incubaron durante la noche en una incubadora con agrupaciones de péptidos a una concentración de 5 mg por ml en una placa de ELISpot precubierta, (Mab-Tech, ELISpot Plus de IFN- γ humano). Al día siguiente, las células se lavaron, y las placas se desarrollaron mediante un anticuerpo de detección anti-IFN- γ biotinilado, seguido de un cojugado de estreptavidina-enzima, lo cual generó manchas visibles. Cada mancha corresponde a una célula secretora de citocinas individual. Una vez desarrolladas las placas, las manchas se barrieron y cuantificaron mediante el uso del microanalizador CTL S6 (CTL) con *software* ImmunoCapture e ImmunoSpot. Los valores se muestran como el promedio con fondo restado de los triplicados medidos. La calificación del ensayo ELISpot determinó que 12 unidades formadoras de manchas era el límite de detección más bajo. Por lo tanto, cualquier valor por encima de este corte se considera una señal de una respuesta celular específica contra el antígeno.

[0350] Ensayo por citometría de flujo de la proteína espicular de SARS-CoV-2 con INO-4800.

[0351] También se usaron PBMC para el análisis por tinción de citocinas intracelulares (ICS) mediante citometría de flujo. Un millón de PMBC en 200 ml de medios RPMI completos se estimularon durante seis horas (37 °C, 5 % de CO₂) con DMSO (control negativo), PMA y ionomicina (control positivo, 100 ng/ml y 2 mg/ml, respectivamente), o con las agrupaciones de péptidos indicadas (225 μ g/ml). Una hora después de la estimulación, se agregaron brefeldina A y monensina (BD GolgiStop y GolgiPlug, 0,001 % y 0,0015 %, respectivamente) para bloquear la secreción de las citocinas expresadas. Después de la estimulación, las células se movieron a 4 °C durante la noche. A continuación, las células se lavaron en PBS para la tinción Live/Dead (tinte de viabilidad fijable de Live/Dead aqua de Life Technologies) y luego se volvieron a suspender en amortiguador FACS (0,5 % de BSA, EDTA 2 mM, HEPES 20 mM). Luego, los marcadores extracelulares se tiñeron, y las células se fijaron y se permeabilizaron (eBioscience™ Fc γ 3Kit) y, luego, se tiñeron para detectar las citocinas indicadas (Tabla 9) mediante el uso de anticuerpos conjugados de manera fluorescente. Las Figuras 22A y B muestran estrategias de regulación representativas para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como ejemplos de expresión positiva de IFN γ , TNF α , IL-2 e IL-4.

[0352] Análisis estadístico.

[0353] Ningún análisis de potencia formal fue aplicable a este ensayo. Se utilizaron estadísticas descriptivas para resumir los criterios de valoración de seguridad: proporciones con AE, reacciones en el sitio de administración y AESI en 8 semanas. También se utilizaron estadísticas descriptivas para resumir los criterios de valoración de inmunogenicidad: mediana de respuestas (con 95 % de intervalos de confianza) y porcentaje de respondedores para resultados celulares, y media geométrica de títulos (con 95 % de intervalos de confianza) y porcentaje de respondedores para resultados humorales. Se llevaron a cabo análisis *post-hoc* de diferencias emparejadas después de la vacunación menos antes de la vacunación en respuestas de neutralización del SARS-CoV-2 (en la escala logarítmica natural, con una prueba t emparejada), respuestas de ELISpot (con pruebas de rango firmado de Wilcoxon) y respuestas de ensayo de flujo intracelular (con pruebas de rango firmado de Wilcoxon).

[0354] Resultados

[0355] Datos demográficos de la población del estudio.

[0356] Se cribó un total de 55 participantes y se inscribieron 40 participantes en los dos grupos iniciales (**Figura 16**). La mediana de edad fue de 34,5 años (rango de 18 a 50 años). El 55 % (22/40) de los participantes eran hombres (Tabla 6). La mayoría de los participantes eran caucásicos (82,5 %, 33/40).

[0357] Seguridad y tolerabilidad de la vacuna.

[0358] Un total de 39 de 40 (97,5 %) participantes completaron ambas dosis; un participante en el grupo de 2,0 mg dejó de participar en el ensayo antes de recibir la segunda dosis debido a la falta de transporte a los sitios clínicos, y la interrupción no estaba relacionada con el estudio ni con las dosis (**Figura 16**). Todos los 39 sujetos restantes completaron la visita 8 semanas después de la dosis 1. Hubo un total de 11 eventos adversos (AE) locales y sistémicos informados a las 8 semanas después de la dosis 1; seis de los cuales se relacionaron con la vacuna (Tabla 10). Todos los AE fueron de grado 1 (leves). Cinco de los seis AE relacionados fueron reacciones en el sitio de inyección, que incluyeron dolor en el sitio de inyección (3) y eritema (2). Un AE sistémico de grado 1 relacionado con la vacuna fueron náuseas. Todos los AE relacionados se produjeron el día de la dosis cuando los sujetos recibieron la primera o la segunda vacunación. No hubo reacciones febriles y no se utilizaron medicamentos antipiréticos después de la vacunación. Ningún sujeto dejó el ensayo debido a un AE. No se informaron eventos adversos graves (SAE) ni eventos adversos de especial interés (AESI). No hubo valores de laboratorio anormales que los investigadores

consideraron clínicamente significativos durante el período de seguimiento inicial de 8 semanas. No hubo un aumento en la cantidad de participantes que experimentaron AE relacionados con la vacuna en el grupo de 2,0 mg (10 %, 2/20), en comparación con la del grupo de 1,0 mg (15 %, 3/20) (**Figura 19**). Además, no hubo un aumento en las frecuencias de AE con la segunda dosis en comparación con la primera dosis en ambos grupos de dosis.

[0359] Tabla 10. Cantidad de eventos adversos clasificados por clase de órganos y sistemas de MedDRA®, gravedad y la relación con la vacunación del estudio asignada por el investigador

MedDRA® Clase de órganos y sistemas	Gravedad	Sin relación con la vacunación	Relación con la vacunación	Cantidad total
Cualquier clase de órganos y sistemas	Leve	5	6	11
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
Trastornos gastrointestinales	Leve	1	1	2
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
	Leve	-	5	5
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
Trastornos generales y afecciones en el sitio de administración	Leve	2	-	2
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
Lesión, intoxicación y complicaciones del procedimiento	Leve	1	-	1
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
Neoplasia benigna, maligna y no especificada	Leve	1	-	1
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-
Trastornos del sistema nervioso	Leve	1	-	1
	Moderada	-	-	-
	Grave	-	-	-

[0360] Inmunogenicidad.

[0361] Se incluyeron a 38 sujetos en los análisis de inmunogenicidad. Además de un sujeto en el grupo de 2,0 mg que abandonó el estudio antes de completar la dosificación, un sujeto en el grupo de 1,0 mg se consideró seropositivo al inicio y, por ende, se excluyó. Los datos de este sujeto se pueden encontrar en la Tabla 11.

[0362] Tabla 11. Respuestas inmunitarias del sujeto seropositivo en la inscripción,

grupo de dosis de 1,0 mg de INO-4800

Ensayo de inmunidad	Resultado en la semana 0	Resultado en la semana 6
Neutralización en la semana 6 Título recíproco	785	1089
Anticuerpo de unión a RBD Título recíproco en la semana 6	1	1
Anticuerpo de unión a S1+S2 Título recíproco en la semana 6	1	14580
Semana del ELISpot de IFN- γ 6 SFU/10 ⁶ PBMC	55,6	27,8

[0363] Respuestas inmunitarias humores.

[0364] Se evaluó la capacidad de los sueros para unirse a la proteína espicular S1+S2. El 89 % (17/19) de los participantes en el grupo de 1,0 mg y el 95 % (18/19) de los participantes en el grupo de 2,0 mg tuvieron un aumento en los títulos de unión a IgG contra la proteína espicular S1+S2 en comparación con su punto temporal antes de la vacunación (semana 0), con la GMT de respuesta de 655,5 (95 % de CI: 255,6, 1681,0) y 994,2 (95 % de CI: 395,3, 2500,3) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente (**Figura 17B**, **Figura 20** y Tabla 13). Los sueros también se evaluaron para determinar su capacidad para neutralizar virus vivo mediante el ensayo de neutralización PRNTIC50 de virus vivo. El aumento en veces de la media geométrica en la semana 6 con respecto al inicio fue de 10,8 con un 95 % de CI de (4,4, 27,0) y 11,5 con un 95 % de CI de (5,3, 24,9) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. En cada grupo, hubo un aumento estadísticamente significativo en la semana 6 con respecto al inicio ($P < 0,0001$, prueba t emparejada, análisis *post-hoc*), **Figura 17A**. En la semana 6, el porcentaje de respondedores fue de 78 % (14/18) y 84 % (16/19) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente (**Figura 17A** y Tabla 13), y la media geométrica de título (GMT) de los respondedores fue de 102,3 (95 % de CI: 37,4, 280,3) y 63,5 (95 % de CI: 39,6, 101,8) en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. La seroconversión general (definida como aquellos participantes que respondieron con anticuerpos de neutralización y/o unión contra la proteína S) en la semana 6 en los grupos de 1,0 mg y 2,0 mg fue de 95 % (18/19) para cada grupo (Tabla 13).

[0365] Immunospot ligado a enzimas (ELISpot).

[0366] El porcentaje de respondedores en la semana 8 fue del 74 % (14/19) en el grupo de dosis de 1,0 mg y 100 % (19/19) i en el grupo de dosis de 2,0 mg. Estos datos, tomados con los datos de seroconversión, dan como resultado una respuesta

inmunitaria general del 100 % (19/19) en cada grupo (Tabla 13, **Figuras 18A y 21**). La mediana de SFU por 10^6 PBMC fue de 46 (95 % de CI: 21,1, 142,2) y 71 (95 % de CI: 32,2-194,4) para los respondedores en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. La mediana de cambio en la semana 8 con respecto al inicio fue de 22,3 (95 % de CI: 2,2, 63,4) y 62,8 (95 % de CI: 22,2, 191,1) en los respectivos grupos y, en cada grupo, hubo aumentos estadísticamente significativos con respecto al inicio ($P= 0,001$ y $P<0,0001$, respectivamente, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*), Figura 18A. También cabe destacar que 3 muestras de convalecientes (los 3 con síntomas, pero que no requirieron hospitalización) evaluadas mediante el ensayo ELISpot mostraron respuestas de linfocitos T más bajas, con una mediana de 33, que el grupo de dosis de 2,0 mg la semana 8 (**Figura 20**). Como se muestra en las **Figuras 18B y 18G**, las respuestas de linfocitos T del grupo de 2,0 mg se mapearon con respecto a 5 agrupaciones de epítomos. Fue alentador que se observaron respuestas de linfocitos T en todas las regiones de la proteína espicular, en donde la agrupación dominante abarcaba la región del dominio de unión al receptor, seguidas de agrupaciones que abarcaban el dominio del terminal N, así como el péptido de fusión, repetición Heptad 1 y la hélice central.

[0367] Ensayo de flujo intracelular.

[0368] La contribución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ a la respuesta inmunitaria celular contra INO-4800 se evaluó mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS). En el grupo de dosis de 2,0 mg, la mediana de cambio con respecto al inicio para la semana 6 en linfocitos T CD8+ que producen IFN- γ , TNF- α y/o IL-2 (cualquier respuesta) fue de 0,11 con un 95 % de CI de (-0,02, 0,23); el cambio aumentó significativamente ($P= 0,0181$, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*) principalmente debido a aumentos significativos en IFN- γ , así como a la producción de TNF- α (**Figura 18C**). También en el grupo de dosis de 2,0 mg, la mediana de cambio con respecto al inicio para la semana 6 en linfocitos T CD4+ que producen TNF- α fue de 0,02 con un 95 % de CI de (de 0,01 a 0,09); el cambio también aumentó significativamente ($P= 0,0020$, prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*, **Figura 18C**). La composición de los linfocitos T CD4+ o CD8+ que producen cualquier citocina (IFN- γ , TNF- α o IL-2 tras la vacunación) también se evaluó para detectar los marcadores superficiales CCR7 y CD45RA con el fin de caracterizar las células efectoras (CCR7-CD45RA+), de memoria efectoras (CCR7-CD45RA-) y de memoria central (CCR7+CD45RA-) (**Figura 18D**). En ambos grupos de dosis, los linfocitos T CD8+ que producen citocinas en

respuesta a la estimulación con péptidos de la espícula del SARS-CoV-2 se balancearon generalmente en las tres poblaciones, mientras que los linfocitos T CD4+ fueron predominantemente del fenotipo de memoria central (**Figura 18D**). Tras la vacunación, los linfocitos T CD4+ y CD8+ se exploraron adicionalmente para determinar su capacidad para producir más de una citocina por vez, y cabe destacar que casi la mitad (41 %) de los linfocitos T CD8+ en el grupo de dosis de 2,0 mg producían tanto IFN- γ como TNF- α (**Figura 18E**). Los linfocitos T CD8+ que producen citocinas en el grupo de dosis de 1,0 mg fueron células productoras de IFN- γ principalmente monofuncionales (57 %). El compartimento de linfocitos T CD4+ también fue de naturaleza polifuncional, en donde el 6 % y el 9 % en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente, producían las 3 citocinas, IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Tabla 12). Las respuestas de Th2 también se midieron al evaluar la producción de IL-4, y no se observaron aumentos estadísticamente significativos (prueba de rango firmado de pares apareados de Wilcoxon, análisis *post-hoc*) en ninguno de los grupos después de la vacunación (**Figura 18F**).

[0369] INO-4800 se toleró bien con una frecuencia de AE de grado 1 relacionados con el producto de 15 % (3/20 sujetos) y 10 % (2/20 sujetos) de los participantes en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. Solo se observaron AE de grado 1 en el estudio, lo cual es favorable en comparación con las vacunas autorizadas existentes. El perfil de seguridad de una vacuna contra la COVID-19 exitosa es importante y respalda el amplio desarrollo de INO-4800 en poblaciones en riesgo más serio de tener complicaciones a causa de la infección por SARS-CoV-2, incluso las personas mayores y las personas con comorbilidades. INO-4800 también generó respuestas inmunitarias celulares y humorales equilibradas, ya que los 38 participantes evaluables mostraron respuestas de anticuerpos o linfocitos T, o ambas, tras las dos dosis de INO-4800. Se observaron respuestas humorales medidas mediante anticuerpos de unión o neutralizantes en 95 % (18/19) de los participantes en cada grupo de dosis. Se observaron anticuerpos neutralizantes, medidos mediante un ensayo de neutralización de virus vivo, en 78 % (14/18) y 84 % (16/19) de los participantes, y las correspondientes GMT fueron de 102,3 [95 % de CI (37,4, 280,3)] y 63,5 [95 % de CI (39,6, 101,8)] para los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. El rango se superpone con el de los títulos de IC50 en PRNT informados de pacientes convalecientes, así como los títulos de IC50 en PRNT en NHP que se protegieron en una exposición al SARS-CoV-2. Además, hubo un aumento estadísticamente significativo en los títulos. Cabe destacar que todas las

personas que recibieron la vacuna, a excepción de una que no desarrolló títulos de anticuerpos neutralizantes, respondieron positivamente en el ensayo ELISpot de linfocitos T, lo que sugiere que las respuestas inmunitarias generadas por la vacuna se registran de manera diferencial en estos ensayos. Se observaron respuestas inmunitarias celulares en 74 % (14/19) y 100 % (19/19) de los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. Cabe destacar que INO-4800 generó respuestas de linfocitos T que fueron más frecuentes con una mediana de respuestas de los respondedores más alta (46 [95 % de CI (21,1, 142,2)] en comparación con 71 [95 % de CI (32,2,194,4)] SFU 10^6 PBMC) en los grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg, respectivamente. Estas respuestas de linfocitos T en el grupo de dosis de 2,0 mg fueron de magnitud más alta que las muestras de convalecientes evaluadas (**Figura 18A**). Además, hubo un aumento estadísticamente significativo en las SFU. En los ensayos por citometría de flujo, ambos grupos de dosis de 1,0 mg y 2,0 mg mostraron aumentos en la producción de citocinas de ambos compartimentos de linfocitos T CD4+ y CD8+, especialmente en el grupo de 2,0 mg. El grupo de 2,0 mg exhibió una cantidad de producción de citocinas estadísticamente significativa, incluso IFN- γ y TNF- α y “cualquier citocina” del compartimento de los linfocitos T CD8+ y TNF- α del compartimento de los linfocitos T CD4+ (**Figura 18C**). Cabe destacar que las respuestas de los linfocitos T CD8+ en el grupo de dosis de 2,0 mg fueron dominadas por células que expresan IFN- γ y TNF- α con o sin IL-2 (**Figura 18E** y Tabla 12). En total, estas células representaban casi la mitad de la respuesta de linfocitos T CD8+ totales (42,7 %, Tabla 12).

[0370] En este ensayo de fase 1, la vacunación con INO-4800 produjo respuestas sustanciales de linfocitos T con fenotipo de Th1 aumentado, medidas tanto mediante ELISpot de IFN- γ como por citometría de flujo multiparamétrica, evidenciadas por una mayor expresión de las citocinas de tipo Th1 IFN- γ , TNF- α e IL-2 (**Figura 18C**). La evaluación de respuestas celulares inducidas por INO-4800 mostró la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra el SARS-CoV-2 que exhibían características de diferenciación en células tanto de memoria efectoras como centrales, lo que sugiere que se estableció una respuesta celular persistente (**Figura 18D**). Es importante destacar que esto se logró mientras se minimizaba la inducción de IL-4, una citocina de Th2 prototípica (**Figura 18F**), lo que respalda que esta vacuna tiene un fenotipo inmunitario, junto con la inducción de protección en modelos preclínicos, lo cual hace que sea poco probable que haya riesgo de inducción de la enfermedad mejorada.

[0371] Tabla 12. Polifuncionalidad mediante citometría de flujo

	Cohorte de 1,0 mg		Cohorte de 2,0 mg	
Parámetro	Citocina CD4	Citocina CD8	Citocina CD4	Citocina CD8
Resultado	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
IFN-gamma solamente	31,2	56,7	29,5	27,1
TNF-alfa solamente	20,4	14	20,9	11,2
IL-2 solamente	22,3	16,5	20,1	16,5
IFN-gamma y TNF-alfa solamente	8,0	9,7	6,7	40,6
IFN-gamma y IL-2 solamente	2,1	0,9	0,6	1,3
IL-2 y TNF-alfa solamente	9,6	0,7	13,5	1,2
IFN-gamma, IL-2 y TNF-alfa	26,4	1,5	8,7	2,1

Los porcentajes enumerados son las contribuciones de cada resultado a la respuesta de citocina total

[0372] Tabla 13.

	Cohorte de 1,0 mg			Cohorte de 2,0 mg		
Ensayo de inmunidad	General Valor	Respondedor Valor	Respondedor es [‡] n (%)	General Valor	Respondedor Valor	Respondedor es [‡] n (%)
Neutralización GMT en la semana 6	44,4 [14,6,	102,3 [37,4,	14/18 (78 %)	34,9 [15,8,	63,5 [39,6,	16/19 (84 %)
Título recíproco [95 % de CI] (Rango)	134,8] (1, 11647)	280,3] (13, 11647)		77,2] (1,652)	101,8] (13652)	
Unión a S1+S2 Semana de anticuerpo	331,2 [91,2,	655,5 [255,6,	17/19 (89 %)	691,4 [217,5,	994,2 [395,3,	18/19 (95 %)
6 GMT	1203,2	168,1]		2197,2]	2500,3]	
Título recíproco [95 % de CI] (Rango)	(1, 14580)	(20, 14580)		(1, 14580)	(20, 14580)	
Total Seroconversión (Respuesta en S1+S2 o Neutralización)	N/A	N/A	18/19 (95 %)	N/A	N/A	18/19 (95 %)
IFN-gamma Semana de ELISpot	26,2 de SFU	45,6 [21,1,	14/19 (74 %) ^μ	71 SFU	71 SFU [32,2-	19/19 (100 %) ^μ
Mediana de SFU	8[10,0-	142,2]		[32,2-	194,4]	

por [95 % de CI] (Rango)	64,4] (1, 374,4)	(16,7, 374,4)		194,4] (8,9, 615,6)	(8,9, 615,6)	
General Inmunidad Tasa de respuesta (seroconversión o ELISpot)	N/A	N/A	19/19 (100 %)	N/A	N/A	19/19 (100 %)

La cohorte de 1,0 mg excluye a un sujeto con NP positiva mediante ELISA al inicio

‡ Criterios de respuesta: Neutralización vivo: IC₅₀ en PRNT en la semana 6 ≥10, o ≥4 si se observa actividad de unión en ELISA; unión a S1+S2: valor en la semana 6 >1; unión a RBD: valor en la semana 6 >1; ELISpot: valor ≥12 SFU con respecto a la semana 0

μ - Respondedores generados mediante el uso de los datos de la semana 6 o la semana 8

[0373] ESTUDIO DE FASE I EXPANDIDO

[0374] Aproximadamente 120 voluntarios sanos se evaluarán en tres (3) niveles de dosis (grupos del estudio). Un total de 40 sujetos se inscribirán en cada grupo de estudio. La inscripción en cada grupo del estudio se estratificará por edad; n=20 para 18-50 años, n=10 para 51-64 años y n=10 ≥65 años (Tabla 14).

[0375] Los sujetos serán adultos de al menos 18 años; quienes el investigador considera sanos según su historia clínica, exámenes físicos y signos vitales en el cribado; capaces y dispuestos a cumplir con todos los procedimientos del estudio; resultados de laboratorio en el cribado dentro de los límites normales de pruebas de laboratorio o que el investigador considera que no son clínicamente significativos; índice de masa corporal de 18-30 kg/m² inclusive en el cribado; pruebas serológicas negativas en antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra la hepatitis C y anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el cribado; ECG en el cribado que el investigador considera que no arrojó hallazgos clínicamente significativos (por ejemplo, síndrome de Wolff-Parkinson-White); y deben cumplir con uno de los siguientes criterios con respecto a capacidad reproductiva: mujeres después de la menopausia según se define mediante amenorrea espontánea durante ≥12 meses; estériles por cirugía o que están en pareja con una persona estéril; uso de métodos anticonceptivos eficaces. Los criterios de exclusión son los siguientes: estar embarazada o amamantando, o tener la intención de quedar embarazada o concebir hijos dentro del plazo de duración previsto del ensayo que comienza con la visita de cribado hasta 3 meses después de la última dosis; prueba de

embarazo en suero positiva durante el cribado o prueba de embarazo en orina positiva antes de la dosis; estar participando actualmente o haber participado en un estudio con un producto en investigación dentro de los 30 días anteriores al día 0; exposición previa al síndrome respiratorio agudo grave por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) o haber recibido un producto en investigación para la prevención o el tratamiento de la COVID-19, el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) o el síndrome respiratorio agudo grave (SARS); individuos cuyo trabajo actual los pone en un riesgo alto de exposición al SARS-CoV-2 (por ejemplo, trabajadores de la salud o personal de respuesta ante emergencias que interactúan directamente con pacientes o que brindas atención directa a estos); tener actualmente o haber tenido enfermedad respiratoria, hipersensibilidad o reacciones alérgicas graves a vacunas o fármacos, diagnóstico de diabetes mellitus, hipertensión, neoplasia dentro de los 5 años de cribado o enfermedad cardiovascular; inmunosupresión como resultado de enfermedad subyacente o tratamiento, incluso inmunodeficiencias primarias, uso a largo plazo (≥ 7 días) de glucocorticoides orales o parenterales, uso actual o anticipado de dosis que modifican enfermedades de fármacos antirreumáticos y fármacos que modifican enfermedades biológicas, antecedentes de trasplante de órgano sólido o médula ósea y antecedentes de otra enfermedad inmunosupresora clínicamente significativa o enfermedad autoinmunitaria clínicamente diagnosticada; tener menos de dos sitios aceptables para la inyección ID y la EP, teniendo en cuenta el músculo deltoides y el cuádriceps anterolateral; o tabaquismo, vapeo, o abuso o dependencia activo a drogas, alcohol o sustancias; o cualquier hallazgo por examen físico y/o antecedentes de cualquier enfermedad que, según el investigador del estudio, podría alterar los resultados del estudio o poner en riesgo adicional al paciente debido a su participación en el estudio.

[0376] Todos los sujetos recibirán una dosis el día 0 y la semana 4 (Tabla 15). Los sujetos que acepten recibir una dosis de refuerzo (Tabla 16) la recibirán no antes de la semana 12 de su cronograma de dosificación, y será la misma dosis que recibieron anteriormente en el régimen de dos dosis (día 0 y semana 4). La seguridad y la inmunogenicidad se evaluarán 2 semanas después de la dosis de refuerzo.

[0377] Tabla 14:

Grupo de estudio	Cantidad total de sujetos	Cantidad de sujetos por año	Edad (años)	Semanas de dosis	INO-4800 Dosis por inyección	Cantidad de inyecciones/EP por visita de dosis	INO-4800 Dosis por dosificación Visita	INO-4800 en total Dosis
1	40	20*	18-50	0, 4 (± 5 días), refuerzo opcional ^b	1,0 mg	1	1,0 mg	3,0 mg
		10	51-64					
		10	≥65					
2	40	20*	18-50	0, 4 (± 5 días), Refuerzo opcional ^b	1,0 mg	2 ^a	2,0 mg	6,0 mg
		10	51-64					
		10	≥65					
3	40	20	18-50	0, 4 (± 5 días),	0,5 mg	1	0,5 mg	1,5 mg
		10	51-64					
		10	≥65	Refuerzo opcional ^b				
Total	120		* Estudio base (otros en el estudio expandido)					

^aINO-4800 se inyectará por vía ID seguido de EP en una ubicación aceptable en dos extremidades diferentes en cada visita de dosis

^bLa dosis de refuerzo opcional se administra no antes de la semana 12 de su cronograma de dosificación, y será la misma dosis que recibieron anteriormente en el régimen de dos dosis.

[0378] Los sujetos que no recibirán una dosis de refuerzo opcional se monitorearán en la visita al final del estudio (EOS) en la semana 52 (Tabla 15). En el caso de sujetos que recibirán una dosis de refuerzo opcional, la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo será la visita EOS (Tabla 16).

[0379] Objetivos primarios:

- Evaluar la tolerabilidad y seguridad del INO-4800 administrado por inyección ID seguido de EP en voluntarios adultos saludables
- Evaluar las respuestas inmunitarias celulares y humorales ante el INO-4800 administrado por inyección ID seguido de EP

[0380] Criterios de valoración de seguridad primarios:

- Incidencia de eventos adversos según la clase de órganos y sistemas (SOC), el término preferido (PT), la gravedad y la relación con el producto en investigación. Porcentaje de participantes con eventos adversos (AE) [período de tiempo: Inicio hasta la semana 52 (si no reciben una dosis de refuerzo opcional) o la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (si reciben una dosis de refuerzo opcional)].
- Reacciones en el sitio de administración (es decir, inyección) (descrito según frecuencia y gravedad).

Porcentaje de participantes con reacciones en el sitio de administración (inyección)

[Período de tiempo: Día 0 hasta la semana 52 (si no reciben una dosis de refuerzo

opcional) o la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (si reciben una dosis de refuerzo opcional)].

- Incidencia de eventos adversos de especial interés. Porcentaje de participantes con eventos adversos de especial interés (AESI). [Período de tiempo: Inicio hasta la semana 52 (si no reciben una dosis de refuerzo opcional) o la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (si reciben una dosis de refuerzo opcional)].

[0381] Criterios de valoración de inmunogenicidad primarios:

- Anticuerpos específicos de antígeno de la glucoproteína espicular de SARS-CoV-2 mediante ensayos de unión. Cambio desde el inicio en títulos de anticuerpos específicos contra el antígeno de la glucoproteína espicular de SARS-CoV-2 [período de tiempo: Inicio hasta la semana 52 (si no reciben una dosis de refuerzo opcional) o la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (si reciben una dosis de refuerzo opcional)].
- Respuesta inmunitaria celular específica de antígeno mediante ensayos de IFN-gamma, ELISpot y/o citometría de flujo. Cambio desde el inicio en respuesta inmunitaria celular específica de antígeno [período de tiempo: Inicio hasta la semana 52 (si no reciben una dosis de refuerzo opcional) o la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (si reciben una dosis de refuerzo opcional)].

[0382] Objetivos exploratorios:

- Evaluar el perfil inmunológico expandido al evaluar las respuestas inmunitarias de linfocitos T y B
- Evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una dosis de refuerzo opcional de INO-4800 administrada mediante inyección ID seguida de EP después de un régimen de dos dosis. Criterios de valoración exploratorios:
 - El perfil inmunológico expandido que puede incluir (entre otros) evaluación adicional de cantidades de linfocitos T y B, respuesta de neutralización y cambios moleculares de linfocitos T y B al medir las proteínas inmunológicas y los niveles de mRNA de los genes de interés en todas las semanas como se determinó según la disponibilidad de muestras
 - La incidencia de todos los eventos adversos posteriores a una dosis de refuerzo opcional de INO-4800 administrada mediante inyección ID seguida de EP
 - Anticuerpos neutralizantes y de unión específicos contra el antígeno de la glucoproteína espicular del SARS-CoV-2 posteriores a una dosis de refuerzo opcional de INO-4800 administrada mediante inyección ID seguida de EP
 - Respuesta inmunitaria celular específica de antígeno mediante IFN- γ

ELISpot y/o citometría de flujo posterior a una dosis de refuerzo opcional de INO-4800 administrada mediante inyección ID seguida de EP

[0383] Evaluación de seguridad. Los sujetos se seguirán por seguridad durante la duración del ensayo hasta el EOS o la última visita del sujeto. Los eventos adversos se recopilarán en cada visita (incluso llamadas el día 1 y la semana 36 después de la dosis de refuerzo). Las muestras de laboratorio de sangre y orina se extraerán de acuerdo con el cronograma de eventos (Tabla 15 y 16).

[0384] TABLA 15 – CRONOGRAMA DE EVENTOS EN EL ENSAYO CLÍNICO NO DE REFUERZO

Pruebas y evaluaciones	Cribado ^a	Día 0		Día 1 (+1 d)	Semana 1 (± 3d)	Semana 4 (± 5d)		Semana 6 (± 5d)	Semana 8 (± 5d)	Semana 12 (± 5d)	Semana 28 (± 5d)	Semana 40 (+5d)	Semana 52 (± 5d)
		Antes	Después			Antes	Después						
Consentimiento informado	X												
Criterios de inclusión/exclusión	X												
Antecedentes médicos	X	X											
Datos demográficos	X												
Medicamentos concomitantes	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X
Examen físico ^b	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X
Signos vitales	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X
Altura y peso	X												
CBC con diferencial	X				X			X	X	X	X	X	X
Química ^c	X				X			X	X	X	X	X	X
Serología de VIH, HBV, HCV ^d	X												
Serología del SARS-CoV-2	X												
ECG de 12 derivaciones	X												
Análisis de orina	X				X			X	X	X	X	X	X

rutinario ^e													
Prueba de embarazo ^f	X	X				X							
INO-4800 + EP ^g		X ^h				X ^h							
Datos de EP de descarga ⁱ			X				X						
Eventos adversos ^j	X	X	X	X ^k	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Inmunología (sangre entera) ^l	X	X				X		X	X	X	X	X	X
Inmunología (suero) ^m	X	X				X		X	X	X	X	X	X

Tabla 15 (continuación)

- a. La evaluación de cribado ocurre desde -30 días a -1 día anterior al día 0.
- b. La examinación física completa en solo el cribado y la semana 52 (o cualquier otra visita de discontinuación del estudio). Examen físico dirigido en todas las otras visitas.
- c. Incluye Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, glucosa, BUN, Cr, AST, ALT y TBili.
- d. Anticuerpo contra VIH o prueba rápida, HBsAg, anticuerpo contra HCV.
- e. Tiras reactivas para glucosa, proteína y hematuria. Debe realizarse examinación microscópica si la tira reactiva es anormal.
- f. Prueba de embarazo en suero en el cribado. Prueba de embarazo en orina en otras visitas.
- g. Todas las dosis administradas por inyección intradérmica seguidas de EP.
- h. Para los grupos de estudio 1 y 3, una inyección en la piel, preferentemente sobre el músculo deltoides el día 0 y la semana 4. Para el grupo de estudio 2, dos inyecciones en la piel con cada inyección en un deltoides o cuádriceps lateral diferente, preferentemente sobre el músculo deltoides, el día 0 y la semana 4.
- i. Después de la administración de INO-4800+EP, los datos de EP se descargarán del dispositivo CELLECTRA® 2000 y se proporcionarán a Inovio.
- j. Incluye AE desde el momento de consenso y todas las reacciones del sitio de inyección que califican como un AE.
- k. Llamada de seguimiento para recopilar los AE.
- l. 4 x 8,5 ml (34 ml) de sangre entera en tubos de 10 ml de dextrosa de citrato ácido (ACD, superior amarillo) por punto temporal. Nota: Recolectar un total de 68 ml de sangre entera antes de la primera dosis (cribado y antes de la dosis del día 0).
- m. 1 x 8 ml de sangre en un tubo de recolección de 10 ml de suero superior rojo

por punto temporal. Nota: Recolectar cuatro alícuotas de 1 ml cada una (un total de 4 ml) de suero en cada punto temporal antes de la primera dosis (criado y antes de la dosis del día 0).

[0385] Tabla 16 – Cronograma de eventos en el ensayo clínico de refuerzo

Pruebas y evaluaciones	Visita de dosis de refuerzo		Visita 2 semanas después de la dosis de refuerzo (± 5d)	Visita 12 semanas después de la dosis de refuerzo (± 5d)	Visita 24 semanas después de la dosis de refuerzo (± 5d)	Llamada 36 semanas después de la dosis de refuerzo (+5d)	48 semanas después de la visita de dosis de refuerzo (± 5d)
	Antes	Después					
Medicamentos concomitantes	X		X	X	X		X
Examen físico ^a	X		X	X	X		X
Signos vitales	X		X	X	X		X
CBC con diferencial	X		X	X	X		X
Química ^b	X		X	X	X		X
Análisis de orina rutinario ^c	X		X	X	X		X
Prueba de embarazo ^d	X						
INO-4800 + EP ^e	X ^f						
Datos de EP de descarga ^g		X					
Eventos adversos ^h	X	X	X	X	X	X ⁱ	X
Inmunología (sangre entera) ^j	X		X	X	X		X
Inmunología (suero) ^k	X		X	X	X		X

- La examinación física completa solo en la visita 48 semanas después de la dosis de refuerzo (o cualquier otra visita de discontinuación del estudio). Examen físico dirigido en todas las otras visitas.
- Incluye Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, glucosa, BUN, Cr, AST, ALT y TBili.
- Tiras reactivas para glucosa, proteína y hematuria. Debe realizarse examinación microscópica si la tira reactiva es anormal.
- La prueba de embarazo en orina debe ser negativa antes de recibir la dosis de refuerzo.
- Todas las dosis administradas por inyección intradérmica seguidas de EP.
- Para los grupos de estudio 1 y 3, una inyección en la piel, preferentemente sobre el músculo deltoides (o, alternativamente, en el cuádriceps lateral) en la visita de dosis de refuerzo. Para el grupo de estudio 2, dos inyecciones en la piel con cada inyección en un deltoides o cuádriceps lateral diferente, preferentemente sobre el músculo deltoides, en la visita de dosis de refuerzo.
- Después de la administración de INO-4800+EP, los datos de EP se descargarán del dispositivo CELLECTRA® 2000 y se proporcionarán a Inovio.

- h. Incluye AE desde el momento de consenso y todas las reacciones del sitio de inyección que califican como un AE.
- i. Llamada de seguimiento para recopilar los AE.
- j. 4 x 8,5 ml (34 ml) de sangre entera en tubos de 10 ml de dextrosa de citrato ácido (ACD, superior amarillo) por punto temporal.
- k. 1 x 8 ml de sangre en un tubo de recolección de 10 ml de suero superior rojo por punto temporal.

[0386] Evaluación de la inmunogenicidad. Las muestras de sangre de inmunología se extraerán de acuerdo con el cronograma de eventos (Tabla 15 y 16). La determinación del análisis de las muestras recolectadas para los criterios de valoración inmunológicos se determinarán de manera continua durante el estudio.

[0387] Se espera que INO-4800 administrado ID seguido de EP mediante el uso de CELLECTRA® 2000 en voluntarios sanos se tolere bien, exhiba un perfil de seguridad aceptable y genere respuestas inmunitarias contra la glucoproteína espicular del SARS-CoV-2.

[0388] **Ejemplo 7: ensayo de fase 2/3, aleatorizado, a ciegas, controlado con placebo para evaluar la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia de INO-4800, una vacuna profiláctica contra la enfermedad COVID-19, administrada por vía intradérmica seguida de electroporación (EP) en adultos seronegativos sanos con riesgo alto de exposición al SARS-CoV-2**

[0389] Este es un ensayo multicéntrico de fase 2/3, aleatorizado y controlado con placebo para evaluar la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia de INO-4800 administrado por inyección intradérmica (ID) seguido de electroporación (EP) mediante el dispositivo CELLECTRA® 2000 para prevenir la enfermedad COVID-19 en participantes con riesgo alto de exposición al SARS-CoV-2. El segmento de la fase 2 evaluará la inmunogenicidad y la seguridad en aproximadamente 400 participantes en dos niveles de dosis en tres grupos etarios. La información sobre la seguridad y la inmunogenicidad de este segmento de la fase 2 se utilizará para determinar el nivel de dosis para segmento de eficacia de la fase 3 del estudio que involucra a aproximadamente 6178 participantes.

[0390] Tabla 17.

Grupo	Intervención/tratamiento
Fase experimental 2: Grupo de dosis de INO-4800 1 Los participantes recibirán una inyección intradérmica (ID) de 1,0 miligramo (mg) de INO-4800 seguido de electroporación (EP)	Fármaco: INO-4800 INO-4800 se administrará ID el día 0 y el día 28. Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo

mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de INO-4800 el día 0 y el día 28.
Experimental: Fase 2: Grupo de dosis de INO-4800 2	Fármaco: INO-4800 Se administrará INO-4800
Los participantes recibirán dos inyecciones ID de 1,0 mg (2,0 mg en total por visita de dosis) de INO-4800 seguido de EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	ID el día 0 y el día 28. Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de INO-4800 el día 0 y el día 28.
Comparador de placebo: Fase 2: Grupo de dosis de placebo 1 Los participantes recibirán una inyección ID de placebo seguido de EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	Fármaco: Placebo El amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) se administrará ID el día 0 y el día 28. Otros nombres: • SSC-0001 Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) el día 0 y el día 28.
Comparador de placebo: Fase 2: Grupo de dosis de placebo 2 Los participantes recibirán dos inyecciones ID de placebo seguido de EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	Fármaco: Placebo El amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) se administrará ID el día 0 y el día 28. Otros nombres: • SSC-0001 Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) el día 0 y el día 28.
Experimental: Fase 3: Dosis óptima de INO-4800 Los participantes recibirán una o dos inyecciones ID de 1,0 mg de INO-4800 según los resultados del segmento de la fase 2, seguido de EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	Fármaco: INO-4800 INO-4800 se administrará ID el día 0 y el día 28. Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de INO-4800 el día 0 y el día 28.
Comparador de placebo: Fase 3: Dosis óptima de placebo Los participantes recibirán una o dos inyecciones ID de placebo según los	Fármaco: Placebo El amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) se administrará ID el día 0 y el día

resultados del segmento de la fase 2, seguido de EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 el día 0 y el día 28.	28. Otros nombres: • SSC-0001 Dispositivo: CELLECTRA® 2000 La EP mediante el uso del dispositivo CELLECTRA® 2000 se hará tras la administración ID de amortiguador estéril de solución salina y citrato de sodio (SSC) (SSC-0001) el día 0 y el día 28.
---	---

[0391] Medición del resultado primario:

1. Fase 2: Cambio desde el inicio en la respuesta inmunitaria celular específica de antígeno medida mediante un ensayo Immunospot ligado a enzimas (ELISpot) de interferón-gamma (IFN-γ)

[Período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

2. Fase 2: Cambio desde el inicio en la respuesta de anticuerpos neutralizantes medida mediante un ensayo de neutralización a base de pseudovirus [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

3. Porcentaje de participantes con enfermedad COVID-19 confirmada virológicamente

[Período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

[0392] Mediciones del resultado secundario:

1. Fase 2 y 3: Porcentaje de participantes con reacciones en el sitio de inyección declaradas y no declaradas

[Período de tiempo: Desde el momento del consentimiento hasta 28 días después de la dosis 2 (hasta el día 56)]

2. Fase 2 y 3: Porcentaje de participantes con eventos adversos (AE) sistémicos declarados y no declarados [período de tiempo: Desde el momento del consentimiento hasta 28 días después de la dosis 2 (hasta el día 56)]

3. Fase 2 y 3: Porcentaje de participantes con eventos adversos graves (SAE) [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

4. Fase 2 y 3: Porcentaje de participantes con eventos adversos de especial interés (AESI) [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

5. Fase 3: Porcentaje de participantes que fallecieron por cualquier causa [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

6. Fase 3: Porcentaje de participantes con enfermedad COVID-19 no grave

[período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

7. Fase 3: Porcentaje de participantes con enfermedad COVID-19 grave [período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

8. Fase 3: Porcentaje de participantes que fallecieron por la enfermedad COVID-19 [período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

9. Fase 3: Porcentaje de participantes con infecciones por SARS-CoV-2 confirmadas virológicamente [período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

10. Fase 3: Días hasta la desaparición de los síntomas en participantes con la enfermedad COVID-19 [período de tiempo: Desde 14 días después de completar el régimen de 2 dosis hasta 12 meses después de la dosis 2 (es decir, desde el día 42 hasta el día 393)]

11. Fase 3: Cambio desde el inicio en respuesta inmunitaria celular específica de antígeno medida mediante un ensayo ELISpot de IFN-gamma [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

12. Fase 3: Cambio desde el inicio en la respuesta de anticuerpos neutralizantes medida mediante un ensayo de neutralización a base de pseudovirus [período de tiempo: Inicio hasta el día 393]

[0393] Criterios de elegibilidad

Años elegibles para el estudio: 18 años y más;

sexos elegibles para el estudio: Todos

Depende del género: No;

acepta voluntarios sanos: Sí

[0394] Criterios de inclusión clave:

- Trabajar o residir en un entorno con riesgo alto de exposición al SARS-CoV-2 para personas cuya exposición puede ser relativamente prolongada o cuyo equipo de protección personal (PPE) puede no ser utilizado de manera consistente, especialmente en entornos cerrados
- Tener resultados de pruebas de laboratorio en el cribado dentro de los límites normales o que el investigador considere que no son clínicamente significativos.
- Estar en la menopausia, ser estéril por cirugía o estar en pareja con una

persona estéril, o usar métodos anticonceptivos eficaces con una tasa de falla de <1 % por año cuando se utilizan de manera consistente y correcta desde el cribado hasta 3 meses después de la última dosis.

[0395] Criterios de exclusión clave:

- Enfermedad febril agua con temperatura >100,4°F (38,0 °C) o aparición aguda de síntomas en las vías respiratorias superiores o inferiores (por ejemplo, tos, falta de aire, dolor de garganta).
- Prueba serológica o molecular (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa [RT- PCR]) positiva en SARS-CoV-2 en el cribado
- Estar embarazada o amamantando, o tener la intención de quedar embarazada o concebir hijos dentro del plazo de duración previsto del ensayo que comienza con la visita de cribado hasta 3 meses después de la última dosis.
- Antecedentes conocidos de VIH no controlado en función de un recuento de CD4 menor de 200 linfocitos por milímetro cúbico (/mm³) o una carga viral detectable dentro de los últimos 3 meses.
- Está participando actualmente o ha participado en un estudio con un producto en investigación dentro de los 30 días anteriores al día 0.
- Haber recibido anteriormente una vacuna en investigación para la prevención o el tratamiento de la COVID-19, el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) o el síndrome respiratorio agudo grave (SARS) (haber recibido placebo documentado en un ensayo anterior estaría permitido para la elegibilidad en el ensayo).
- Enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) que requieren cambios significativos en el tratamiento u hospitalización en caso de que la enfermedad empeore durante las 6 semanas antes de la inscripción.
- Inmunosupresión como resultado de enfermedad subyacente o tratamiento
- Falta de sitios aceptables para la inyección ID y la EP
- Haber donado sangre o haberse sometido a una transfusión de sangre 1 mes antes del día 0.
- Abuso o dependencia informada al alcohol o a sustancias, o consumo de drogas ilícitas (a excepción de la marihuana).
- Cualquier enfermedad que, según el investigador, pueda afectar la seguridad del participante o la evaluación de cualquier criterio de valoración del estudio.

[0396] Ejemplo 8: régimen de una o dos dosis de la vacuna de ADN contra el SARS-CoV-2 INO-4800 protege contra la carga de la enfermedad en las vías

respiratorias en un modelo de exposición en primate no humano (NHP)

[0397] La seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia de la administración intradérmica de INO-4800, un candidato de vacuna de ADN sintético que codifica un antígeno espicular del SARS-CoV-2, se evaluó en el modelo de *Macaca mulatta*. Se evaluaron regímenes de vacunación de una y dos dosis. La vacunación indujo anticuerpos tanto de unión como neutralizantes, junto con linfocitos T que producen IFN- γ contra el SARS-CoV-2. Una dosis alta de la cepa Victoria01 del SARS-CoV-2 (5×10^6 pfu) se usó para evaluar específicamente el impacto de la vacunación con INO-4800 sobre la carga de la enfermedad en el pulmón para brindar datos de seguridad y eficacia de la vacuna. Se midió una amplia gama de parámetros de enfermedad de las vías respiratorias inferiores, hibridación *in situ*, RT-PCR de ARN viral y tomografía computarizada (CT) para comprender el impacto de la inmunidad inducida por la vacuna sobre la eficacia protectora y la posible enfermedad exacerbada por la vacuna (VED).

[0398] Este ejemplo describe la evaluación de inmunogenicidad, eficacia y seguridad de la vacuna de ADN contra el SARS-CoV-2 INO-4800 en un modelo riguroso de exposición de primates no humanos a una dosis alta. La administración intradérmica de 1 mg de INO-4800 a *Macaca mulatta* induce respuestas humorales y de linfocitos T contra el antígeno espicular del SARS-CoV-2 tanto en un régimen de 2 dosis como en un régimen subóptimo de 1 dosis. No se registraron eventos clínicos evidentes en los animales a lo largo del estudio. Después de una exposición a una alta dosis de SARS-CoV-2, se observó una reducción de las cargas virales y la carga de la enfermedad pulmonar tanto en el grupo de 1 dosis de vacuna como en el de 2, lo que corrobora la eficacia de INO-4800. Es importante destacar que no se observó una enfermedad exacerbada por la vacuna (VED), ni siquiera en el grupo de 1 dosis.

[0399] Métodos:

[0400] Vacuna. La secuencia de ADN optimizada que codifica la proteína espicular IgELS del SARS-CoV-2 se creó con el algoritmo de optimización génica *in silico* propiedad de Inovio para mejorar la expresión y la inmunogenicidad. La secuencia de ADN optimizada se sintetizó, se digirió con BamHI y XhoI, y se clonó en el vector de expresión pGX0001 bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano y una señal de poliadenilación de una hormona de crecimiento bovina.

[0401] Animales. Dieciocho *Macaca mulatta* de origen indio se usaron en este estudio. Los grupos del estudio comprendieron tres machos y tres hembras de cada

especie, y todos eran adultos de entre 2,5 y 3,5 años de vida y pesaban >4 kg al momento de la exposición. Antes del comienzo del experimento, los animales socialmente compatibles se asignaron aleatoriamente a grupos de exposición para minimizar el sesgo. Los animales se alojaron en grupos socialmente compatibles en jaulas de acuerdo con la *UK Home Office Code of Practice for the Housing y Care of Animals Bred, Supplied o Used for Scientific Procedures* (Código de la Oficina Nacional del Reino Unido para la Práctica de Albergar y Cuidar Animales Criados, Proporcionados o Usados para Procedimientos Científicos) (2014) y las *National Committee for Refinement, Reduction y Replacement (NC3Rs) Guidelines on Primate Accommodation, Care y Use* (Guías del Comité Nacional para el refinamiento, la reducción y el reemplazo (NC3R) sobre el alojamiento, el cuidado y el uso de primates) de agosto de 2006. El alojamiento anterior y durante la exposición se describe en [Salguero, F.J., *et al.*, Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. *bioRxiv*, 2020: p. 2020.09.17.301093.]. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo bajo la autoridad de una licencia de proyecto autorizada por la Oficina Nacional del Reino Unido (PDC57C033) que se había sometido a revisión ética local en PHE Porton Down por parte del Organismo de Revisión Ética y de Bienestar Animal (AWERB) y que se aprobó conforme a la Ley de (Procedimientos Científicos en) Animales Domésticos de 1986. Los animales se sedaron mediante inyección intramuscular (IM) con clorhidrato de ketamina (Ketaset, 100 mg/ml, Fort Dodge Animal Health Ltd, Southampton, Reino Unido; 10 mg/kg) para procedimientos en los que se requería sacarlos de su alojamiento. Ninguno de los animales se había utilizado anteriormente para procedimientos experimentales.

[0402] Administración de la vacuna. Los animales recibieron 1 mg de la vacuna de ADN de SARS-CoV-2, INO-4800, mediante inyección intradérmica solo el día 28 (grupo de 1 dosis) o los días 0 y 28 (grupo de 2 dosis) seguida de un tratamiento por EP con el dispositivo de electroporación de corriente constante adaptativa CELLECTRA 2000® con una matriz 3P (Inovio Pharmaceuticals).

[0403] Se recolectaron suero y sangre entera heparinizada mientras los animales estaban sedados en intervalos bisemanales durante la fase de vacunación. También se recolectaron hisopados faríngeos y nasales el día D56 de la exposición. Después de la exposición, los hisopados nasales, los hisopados faríngeos y el suero se recolectaron 1, 3, 5 días después de la exposición (dpc) y en el momento de la eutanasia (6, 7 u 8 dpc – escalonado debido al alto nivel de trabajo implicado en los procedimientos), y la sangre entera heparinizada se recolectó el 3 dpc y en el

momento de la eutanasia. Los hisopados faríngeos y nasales se obtuvieron como se describió [Salguero, F.J., *et al.*, Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093.].

[0404] Observaciones clínicas. Los animales se monitorearon múltiples veces por día para detectar cambios de comportamiento y clínicos. El comportamiento se evaluó para detectar contraindicaciones, incluso depresión, aislamiento del grupo, agresión, cambios en los patrones de alimentación, el patrón de respiración, la tasa de respiración y la tos. Los animales se observaron y puntuaron de la siguiente manera en lo que respecta a su actividad y salud a lo largo del estudio. Referencia: Nivel de actividad: A0 = activo y alerta; A1 = solo activo cuando lo estimula el operador; A2 = inactivo incluso cuando lo estimulan/inmóvil; H = sano; S = estornudo, C = tos, Nd = descarga nasal, Od = descarga ocular, Rn = ruidos respiratorios, Lb = dificultad para respirar, L = letargo, Di = diarrea, Ax = pérdida de apetito, Dx = deshidratación, RD = angustia respiratoria. El peso corporal, la temperatura y los niveles de hemoglobina del animal se midieron y registraron durante todo el estudio.

[0405] Virus y células

[0406] The Doherty Institute, Melbourne, Australia, proveyó generosamente el SARS-CoV-2 Victoria/01/2020 (Caly, L., *et al.*, Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. *Med J Aust*, 2020. 212(10): p. 459-462) en P1 luego de crecimiento primario en células Vero/hSLAM, y luego se lo transfirió dos veces en PHE Porton Down en células Vero/hSLAM (ECACC 04091501). La infección de las células fue con ~0,0005 MOI de virus y se las recolectó el día 4 mediante la disociación de las células unidas restante mediante la aplicación de un vaivén suave con microesferas de borosilicato de 5 mm estériles, seguida de clarificación mediante centrifugación a 1.000 x g durante 10 min. Se realizó secuenciación de genoma completo, en la reserva de exposición P3, con el uso tanto de Nanopore como de Illumina como se describe en Lewandowski, K., *et al.*, Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. *J Clin Microbiol*, 2019. 58(1). Se determinó el título viral de las reservas de exposición mediante ensayo en placas con células Vero/E6 (ECACC 85020206). Se obtuvieron líneas celulares de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) PHE, Porton Down, Reino Unido. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en medio esencial mínimo (MEM) (Life Technologies, California, EE. UU.) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Sigma,

Dorset, Reino Unido) y HEPES 25 mM (Life Technologies, California, EE. UU.). Además, los cultivos de Vero/hSLAM se complementaron con 0,4 mg/ml de geneticina (Invitrogen) para mantener el plásmido de expresión. Se realizaron diluciones de la sustancia de exposición en solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El inóculo (5×10^6 PFU) se administró por vía intratraqueal (2 ml) y mediante instilación intranasal (1,0 ml en total, 0,5 ml por fosa nasal).

[0407] Signos clínicos y formación de imágenes en vida mediante tomografía computarizada

[0408] Se realizaron tomografías computarizadas dos semanas antes y cinco días después de la exposición a SARS-CoV2. Las tomografías computarizadas se realizaron en animales sedados con un escáner de Lightspeed CT de 16 cortes (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, EE. UU.), tanto en la posición decúbito prono como en la posición decúbito supino, y un radiólogo experto en enfermedades respiratorias evaluó los escaneos (como se describió anteriormente (Salguero, F.J., *et al.*, Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093)). Para permitir discriminar las diferencias entre NHP individuales con bajo volumen de la enfermedad (es decir, <25 % de afectación pulmonar), se diseñó un refinado sistema de puntuación en el que las puntuaciones se atribuían en función de poseer características anormales típicas de COVID en pacientes humanos (puntuación de patrón de COVID) y en función de la distribución de las características en el pulmón (puntuación de zona). La puntuación de patrón de COVID se calculó como la suma de las puntuaciones asignadas a la cantidad de nódulos identificados, y a la posesión y el grado de GGO y la consolidación de acuerdo con el siguiente sistema: nódulos: Puntuación 1 para 1, 2 para 2 o 3, 3 para 4 o más; GGO: cada área afectada recibió una puntuación de acuerdo con lo siguiente: Puntuación 1 si el área medía <1 cm, 2 si medía de 1 a 2 cm, 3 si medía 2-3 cm, 4 si medía >3 cm, y las puntuaciones de cada área de GGO se sumaron para proporcionar una puntuación de GGO total; consolidación: cada área afectada recibió una puntuación de acuerdo con lo siguiente: 1 si el área medía <1 cm, 2 si medía de 1 a 2 cm, 3 si medía 2-3 cm, 4 si medía >3 cm. Las puntuaciones de cada área de consolidación se suman para proporcionar una puntuación de consolidación total. Para tomar en cuenta el impacto adicional estimado de la enfermedad sobre el huésped de consolidación en comparación con GGO, el sistema de puntuación se ponderó duplicando la puntuación asignada a la consolidación. Para determinar la puntuación de zona, el pulmón se dividió en 12 zonas y cada lado del

pulmón se dividió (de arriba a abajo) en tres zonas: la zona superior (por encima de la carina), la zona media (de la carina a la vena pulmonar inferior) y la zona inferior (por debajo de la vena pulmonar inferior). Cada zona se dividió adicionalmente en dos áreas: el área anterior (el área antes de la línea vertical del punto medio del diafragma en la posición sagital) y el área posterior (el área después de la línea vertical del punto medio del diafragma en la posición sagital). Esto da como resultado 12 zonas en total en donde una puntuación de uno se atribuye a cada zona que contiene cambios estructurales. La puntuación de patrón de COVID y la zona se suman para proporcionar la puntuación de CT total.

[0409] Histopatología y examinación *post mortem*. Los animales se sometieron a eutanasia en 3 puntos temporales diferentes, en grupos de seis (que incluían un animal de cada especie y sexo) a los 6, 7 y 8 dpc. Se recolectó el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) del pulmón derecho al momento de la necropsia. El pulmón izquierdo se disecó antes de la recolección del BAL y se usó para procedimientos de histopatología y virología posteriores. Al momento de la necropsia se tomaron hisopados nasales y faríngeos, sangre entera heparinizada y suero junto con muestras de tejido para histopatología. Muestras de los lóbulos craneal izquierdo y caudal izquierdo del pulmón, junto con muestras del bazo, riñón, hígado, ganglios linfáticos mediastínicos y axilares, intestino delgado (duodeno), intestino grueso (colon), tráquea, sitio de inoculación de la laringe y ganglio linfático de drenaje, se fijaron mediante inmersión en 10 % de formalina amortiguada neutra y se procesaron de manera rutinaria en cera de parafina. Se cortaron porciones de cuatro μm , se las tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) y se las examinó microscópicamente. Se usó un sistema de puntuación de histopatología pulmonar (Salguero, F.J., *et al.*, Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093) para evaluar las lesiones que afectan las vías respiratorias y el parénquima. Se usaron tres porciones tisulares de cada lóbulo pulmonar izquierdo para evaluar la histopatología pulmonar. Además, las muestras se tiñeron con la técnica de RNAscope para identificar el ARN del virus SARS-CoV-2 en porciones de tejido pulmonar. Sucintamente, los tejidos se trataron previamente con peróxido de hidrógeno durante 10 min (RT), Target Retrieval durante 15 min (98-102 °C) y Protease Plus durante 30 min (40 °C) (Advanced Cell Diagnostics). Se incubó una sonda de V-nCoV2019-S (específica del gen espicular de SARS-CoV-2) en los tejidos durante dos horas a 40 °C. Además, las muestras se tiñeron con la técnica de RNAscope para identificar el ARN del virus SARS-CoV-2. Se llevó a cabo una

amplificación de la señal según el protocolo de RNAscope mediante el uso del kit RNAscope 2,5 HD Detection kit – Red (Advanced Cell Diagnostics, Biotechne). Todos los portaobjetos teñidos con H&E e ISH se escanearon digitalmente con un escáner Panoramic 3D-Histech y se observaron con el *software* CaseViewer v2.4. Se evaluó la presencia de ARN viral mediante ISH con el uso de todos los portaobjetos con porción de tejido pulmonar. Se realizó un análisis de imágenes digitales en portaobjetos etiquetados con RNAscope para determinar el porcentaje de células teñidas dentro de las lesiones, con el uso del paquete de *software* Nikon-NIS-Ar.

[0410] Cuantificación de la carga viral mediante RT-qPCR. Se aisló ARN de hisopados nasales e hisopados faríngeos. Las muestras se inactivaron en AVL (Qiagen) y etanol. Luego se realizó una extracción corriente abajo con el kit BioSprint™96 One-For-All vet kit (Indical) y la plataforma Kingfisher Flex, según las instrucciones del fabricante. Los tejidos se homogeneizaron en amortiguador RLT+ betamercaptoetanol (Qiagen). El homogeneizado tisular luego se centrifugó a través de un homogeneizador QIAshredder (Qiagen) y se complementó con etanol según las instrucciones del fabricante. Luego se realizó una extracción corriente abajo a partir de muestras de tejido con el kit BioSprint™96 One-For-All vet kit (Indical) y la plataforma Kingfisher Flex, según las instrucciones del fabricante.

[0411] Se usó transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) dirigida a una región del gen de la nucleocápside (N) de SARS-CoV-2 para determinar las cargas virales y se la llevó a cabo con TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (Applied Biosystems™), 2019-nCoV CDC RUO Kit (Integrated ADN Technologies) y QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System. Las secuencias de los cebadores y la sonda de N1 fueron las siguientes: 2019-nCoV_N1-directo, 5' GACCCCAAATCAGCGAAAT 3' (SEQ ID NO: 18) ; 2019-nCoV_N1-inverso, 5' TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG 3' (SEQ ID NO: 19); 2019-nCoV_N1-sonda, 5' FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1 3' (SEQ ID NO: 20). Las condiciones de ciclización fueron las siguientes: 25 °C durante 2 minutos, 50 °C durante 15 minutos, 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 3 segundos, 55 °C durante 30 segundos. El estándar de cuantificación fue ARN transcrito *in vitro* del ORF de SARS-CoV-2 N (número de acceso NC_045512.2) con una cuantificación de entre 1 y 6 copias log/μL. Las muestras de hisopado y fluido positivas detectadas por debajo del límite de cuantificación (LoQ) de 4,11 copias log/ml recibieron el valor de 5 copias/μL, lo que equivale a 3,81 copias log/ml, mientras que las muestras no detectadas recibieron el valor de <2,3 copias/μL, lo que equivale al

límite de detección (LoD) inferior del ensayo, lo que equivale a 3,47 copias log/ml. Las muestras de tejido positivas detectadas por debajo del límite de cuantificación (LoQ) de 4,76 copias log/ml recibieron el valor de 5 copias/μL, lo que equivale a 4,46 copias log/g, mientras que las muestras no detectadas recibieron el valor de <2,3 copias/μL, lo que equivale al límite de detección (LoD) inferior del ensayo, lo que equivale a 4,76 copias log/g.

[0412] Se realizó RT-qPCR subgenómica en el QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System con TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y los oligonucleótidos especificados por Wölfel, *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465–469 (2020), con cebador directo, sonda y cebador inverso a una concentración final de 250 nM, 125 nM y 500 nM, respectivamente. Las secuencias de los cebadores y la sonda de sgE fueron las siguientes:

2019-nCoV_sgE-directo, 5' CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 21);

2019-nCoV_sgE-inverso, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3' (SEQ ID NO: 22);

2019-nCoV_sgE-sonda, 5' FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3' (SEQ ID NO: 23).

[0413] Las condiciones de ciclización fueron 50 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Se cuantificaron los amplicones de RT-qPCR contra un estándar de ARN transcrito *in vitro* del ORF SARS-CoV-2 E de longitud completa (número de acceso NC_045512.2) precedido por la secuencia líder UTR y la secuencias reguladora de la transcripción del gen E putativo descrita por Wolfel *et al.* (Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465–469 (2020)). Las muestras positivas detectadas por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) recibieron el valor de 5 copias/μL, mientras que las muestras no detectadas recibieron el valor de <0,9 copias/μL, lo que equivale al límite inferior de detección (LLOD) del ensayo. Para hisopados nasales, hisopados faríngeos y muestras extraídas de muestras de BAL, esto equivale a un LLOQ de 4,11 copias log/ml y un LLOD de 3,06 copias log/ml. Para muestras de tejido, esto equivale a un LLOQ de 4,76 copias log/g y un LLOD de 3,71 copias log/g.

[0414] Prueba de neutralización de la reducción de placas. Los títulos de virus neutralizantes se midieron en muestras de suero inactivadas por calor (56 °C durante 30 minutos). SARS-CoV-2 se diluyó hasta una concentración de $1,4 \times 10^3$ pfu/ml (70

pfu/50 μ L) y se mezcló a razón de 50:50 en 1 % de FCS/MEM con dobles diluciones de suero de 1:10 a 1:320 en una placa con fondo en forma de V de 96 cavidades. La placa se incubó a 37 °C en una caja humidificada durante una hora para permitir que el anticuerpo en las muestras de suero neutralice el virus. El virus neutralizado se transfirió a las cavidades de una placa lavada de 24 cavidades de ensayo con placas (ver el método de ensayo con placas), se permitió su adsorción a 37 °C por una hora más, y se lo revistió con medio de revestimiento de ensayo con placas. Después de cinco días de incubación a 37 °C en una caja humidificada, las placas se fijaron y se tiñeron, y se contaron las placas.

[0415] ELISA de unión al antígeno. Se determinaron respuestas de IgG específicas de RBD y la proteína espicular de SARS-CoV-2 recombinante mediante ELISA. Se obtuvo una versión trimérica y estabilizada de longitud completa de la proteína espicular de SARS-CoV-2 a través de Lake Pharma (N.º 46328). MassBiologics desarrolló y suministró amablemente el dominio de unión al receptor de SARS-CoV-2 recombinante (319-541) Myc-His. Placas de 96 cavidades y alta unión (Nunc Maxisorp, 442404) se recubrieron con 50 μ L por cavidad de 2 μ g/ml de trímero de proteína espicular (S1+S2) o RBD en 1x PBS (Gibco) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas de ELISA se lavaron y se bloquearon con 5 % de suero bovino fetal (FBS, Sigma, F9665) en 1x PBS/0,1 % de Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente. El suero recolectado de animales después de la vacunación se sometieron a una dilución inicial de 1/50, seguida de 8 diluciones en serie de dos veces. Las muestras posteriores a la exposición se inactivaron en 0,5 % de Triton y se sometieron a una dilución inicial de 1/100, seguida de 8 diluciones en serie de tres veces. Se realizaron diluciones en serie en 10 % de FBS en 1x PBS/0,1 % de Tween 20. Después de lavar las placas, se agregaron 50 μ L/cavidad de cada dilución de suero a la placa recubierta con antígeno por duplicado y se los incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el lavado, se diluyó (1:10,000) anti-IgG de mono conjugado con HRP (Invitrogen, PA1-84631) en 10 % de FBS en 1X PBS/0,1 % de Tween 20 y se agregaron 100 μ L/cavidad a la placa. Las placas luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se preparó 1 mg/ml de solución de diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma P9187) y se agregaron 100 μ L por cavidad. El desarrollo se detuvo con 50 μ L por cavidad de ácido clorhídrico 1M (Fisher Chemical, J/4320/15) y la absorbancia a 490 nm se leyó en un lector de placas VersaMax de Molecular Devices con el uso de Softmax (versión 7.0). Se determinaron títulos con el método de determinación de títulos de valoración. Para cada muestra, un título de valoración se

define como la cantidad recíproca de la mayor dilución de muestra que proporciona una lectura (OD) por encima del corte. El corte se determinó para cada grupo experimental como la media de OD + 3SD de las muestras sin tratamiento previo.

[0416] Aislamiento y resucitación de células mononucleares de sangre periférica. Se aislaron PBMC de sangre entera anticoagulada con heparina (132 unidades por 8720 ml de sangre) (BD Biosciences, Oxford, UK) mediante el uso de métodos estándar. Las PBMC aisladas de tejidos se almacenaron a -180 °C. Para la resucitación, se descongelaron PBMC, se las lavó en medio R10 (que consistía en RPMI 1640 complementado con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina-50 µg/ml de estreptomicina, y 10 % de FBS inactivado por calor) con 1 U/ml de DNasa (Sigma), y se las volvió a suspender en medio R10 y se las incubó a 37 °C con 5 % de CO₂ durante la noche.

[0417] ELISpot. Se usó un ensayo ELISpot de IFN γ para estimar la frecuencia y la capacidad de producción de IFN γ de linfocitos T específicos de SARS-CoV-2 en PBMC con el uso de un kit de IFN γ de ser humano/simio (MabTech, Nacka. Suecia), como se describió anteriormente (Sibley, L.S., *et al.*, ELISPOT Refinement Using Spot Morphology for Assessing Host Responses to Tuberculosis. *Cells*, 2012. 1(1): p. 5-14). Las células se evaluaron a 2 x 10⁵ células por cavidad. Las células se estimularon durante la noche con grupos de péptidos SARS-CoV-2 presentes en toda la proteína espicular ECD. Se usaron cinco grupos de péptidos, que comprendían péptidos 15meros, superpuestos con 9 aminoácidos. Se usaron 12-miristato de forbol (Sigma) (100 ng/ml) y ionomicina (CN Biosciences, 753 Nottingham, Reino Unido) (1 mg/ml) como control positivo. Los resultados se calcularon e informaron como unidades formadoras de manchas (SFU) por millón de células. Todos los péptidos de SARS-CoV-2 se evaluaron por duplicado y las cavidades solo con medio se sustrajeron para obtener las SFU específicas del antígeno. Las placas de ELISPOT se analizaron con un escáner y *software* de CTL (CTL, Alemania) y se llevó a cabo un análisis adicional con GraphPad Prism (GraphPad Software, EE. UU.).

[0418] Estadísticas. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del *software* GraphPad Prism 7 u 8 (La Jolla, CA). Estos datos se consideraron significativos si $p < 0,05$. El tipo de análisis estadístico realizado se detalla en la leyenda de la figura. No se excluyeron muestras ni animales del análisis.

[0419] Resultados:

[0420] Inmunogenicidad de los regímenes de una y dos dosis de INO-4800. Doce (6 machos y 6 hembras) *Macaca mulatta* se vacunaron con 1 dosis (6 animales) o 2

dosis (6 animales) de INO-4800 el día 28 o los días 0 y 28, respectivamente (**Figura 22A**). Para cada tratamiento, se administró por vía intradérmica 1 mg de INO-4800, seguido de CELLECTRA-ID EP. Seis animales adicionales de edad y sexo equivalentes no se vacunaron y conformaron el grupo de control. Los animales se observaron y calificaron como alertas y sanos durante todo el estudio, y no se registraron eventos adversos o anomalías clínicas en los animales (**Figura 23**). Los títulos séricos de anticuerpos IgG reactivos con el antígeno espicular de SARS-CoV-2 en todos los animales se midieron dos veces por semana entre los días 0 y 56. En el grupo de una dosis (INO-4800 X1), una media de títulos de valoración de 467 contra la forma ECD S1 + S2 trimérica del antígeno espicular de SARS-CoV-2 y 442 contra el antígeno de RBD, y un título de neutralización de virus vivo (Victoria/01/2020 emparejado a la cepa de exposición) de 239 14 días después de la vacunación (**Figuras 22B-D**). En el grupo de 2 dosis (INO-4800 X2), se midió una media de títulos de valoración de 2.142 contra el ECD S1 + S2 y 1.538 contra el antígeno de RBD, y un título de neutralización de virus vivo de 2.199 14 días después de la segunda vacunación (**Figuras 22B-D**). La vacunación con INO-4800 indujo respuestas de linfocitos T Th1 específicas del antígeno espicular de SARS-CoV-2 en la población de PBMC según lo medido con un ELISpot de IFN- γ (**Figura 22E**). En resumen, la administración intradérmica de INO-4800 indujo una respuesta de linfocitos T y humoral funcional contra la proteína espicular de SARS-CoV-2 que se reforzó después de una segunda dosis. El día de la exposición viral (día 56), el nivel de anticuerpos neutralizantes de SARS-CoV-2 en el suero fue significativamente mayor en los grupos vacunados que en el grupo de control ($p = 0,015$). Tras la exposición viral, hubo un leve aumento en la unión a la proteína espicular de SARS-CoV-2 y en los títulos de anticuerpos neutralizantes en todos los grupos entre los días 56 y 62-64 (**Figuras 22B-D**). En el grupo de control hubo un aumento de la respuesta inmunitaria celular a los péptidos presentes en todo el antígeno espicular de SARS-CoV-2 después de la exposición viral, pero poco cambio en los grupos vacunados, probablemente debido al control de la infección viral por parte del brazo humoral del sistema inmunitario del huésped (**Figura 22F**).

[0421] Cargas virales en los tractos respiratorios superior e inferior después de la exposición a SARS-CoV-2 **[0422]** El día 56, todos los animales se expusieron a un total de 5×10^6 pfu de SARS-CoV-2 administradas tanto al tracto respiratorio superior como al inferior. No se observaron síntomas clínicos evidentes en toda la duración (6-8 días) de la exposición en ninguno de los animales (**Figuras 23A-23C**). En los puntos

temporales indicados, se recolectaron hisopados nasales y faríngeos de los animales. SARS-CoV-2 genómico viral (ARN viral) y subgenómico (sgmARN), que representa virus replicante, se midieron mediante RT-qPCR (**Figuras 24A y 25A**). El análisis de los niveles de área bajo la curva (AUC) de ARN viral en la garganta reveló niveles significativamente reducidos en los grupos vacunados (**Figura 24B**). Además, el nivel máximo de carga viral medido en el grupo INO-4800 X2 era significativamente menor que el del grupo de control (**Figura 24C**). El análisis reveló una correlación negativa significativa entre las cargas virales de la garganta y los títulos de IgG neutralizante y anti-RBD (**Figuras 15A-15D**). Los datos de sgmARN de SARS-CoV-2 revelaron una tendencia similar a la reducción de la carga viral en los grupos vacunados en comparación con los controles (**Figuras 25A-C**). El análisis en el compartimento nasal reveló una tendencia a la reducción y una depuración acelerada del ARN viral y el sgmARN en los grupos vacunados en comparación con el control, pero sin alcanzar un nivel significativo (**Figuras 24D-F y 25D-F**). El análisis reveló una correlación negativa significativa entre las cargas virales nasales y los títulos de IgG neutralizante y anti-RBD el día 3, pero no el día 1 (**Figuras 15E-15H**).

[0423] Al momento de la necropsia (6-8 días después de la exposición), se recolectó fluido de BAL de cada animal. La medición de los niveles de ARN viral y sgmARN de SARS-CoV-2 reveló una reducción de la carga viral promedio en los grupos vacunados, a pesar de que los niveles variaban dentro de cada grupo en función del día de la necropsia (**Figuras 26A, 26B**). También se realizó RT-qPCR en tejidos recolectados al momento de la necropsia. En estos puntos temporales posteriores a la exposición, los niveles de ARN viral de SARS-CoV-2 detectados estaban por debajo del límite de cuantificación en la mayoría de los tejidos, excepto los pulmones (**Figura 27**). Las mediciones del nivel de mARN viral y sgmARN de SARS-CoV-2 detectado en las muestras de tejido pulmonar indicaron una carga viral promedio reducida en los animales vacunados (**Figuras 26C y 26D**).

[0424] En resumen, los datos mostraron una reducción significativa de la carga viral en la garganta, y una tendencia de reducción de las cargas virales en los pulmones de los grupos vacunados. La recolección de muestras de tejido pulmonar y BAL en diferentes puntos temporales (día 6, 7 o 8) posteriores a la exposición contribuyó probablemente al impacto observado de la variabilidad intragrupo sobre el análisis estadístico. Los datos de carga viral de RT-qPCR indican que la vacunación con INO-4800 tiene un efecto positivo sobre la reducción de las cargas virales en *Macaca mulatta* expuestos a una alta dosis de SARS-CoV-2; en general, se midieron niveles

virales menores en el grupo de 2 dosis de vacuna en comparación con el grupo de una dosis de vacuna.

[0425] Carga de la enfermedad en los pulmones tras la exposición a SARS-CoV-2.

[0426] Se evaluó la carga de la enfermedad pulmonar en tejidos pulmonares recolectados en la necropsia de 6 a 8 días después de la exposición. Se realizó un análisis de todos los animales del estudio de manera doble ciega. Se realizó un análisis histopatológico del tejido pulmonar en tejidos de múltiples órganos, pero solo los pulmones presentaron lesiones notables y compatibles con la infección por SARS-CoV-2. Se observaron lesiones pulmonares consistentes con una infección por SARS-CoV-2 en los pulmones de animales del control no vacunado y en menor medida en los grupos vacunados. Se proporcionan imágenes histopatológicas representativas en la **Figura 28**. Sucintamente, el parénquima pulmonar comprendía áreas de multifocales a coalescentes de neumonía rodeadas por parénquima no afectado. El daño alveolar, con necrosis de neumocitos, era una característica prominente en las áreas afectadas. Los espacios alveolares y los tabiques interalveolares contenían células inflamatorias mixtas (incluso macrófagos, linfocitos, neutrófilos viables y degenerados, y eosinófilos ocasionales) y edema. También se observó hiperplasia de neumocitos tipo II en bronquiolos distales y las uniones broncoalveolares. En las vías respiratorias más grandes, se observaron degeneración epitelial, focal y ocasional y desprendimiento de tejido muerto en el epitelio respiratorio. Bajas cantidades de células inflamatorias mixtas, que comprenden neutrófilos, células linfoides y eosinófilos ocasionales infiltraron las paredes bronquiales y bronquiolares. En el lumen de algunas vías respiratorias, se observó mucosa mezclada con células degenerativas, principalmente neutrófilos y células epiteliales. Dentro del parénquima, también se observó engrosamiento perivascular y peribronquiolar, en donde son principalmente células linfoides las que comprenden los infiltrados.

[0427] La puntuación de histopatología y el porcentaje de área tisular de positividad de ARN de SARS-CoV-2 se aplicaron para cuantificar la carga de la enfermedad. El grupo no vacunado mostró las mayores puntuaciones histopatológicas en el pulmón en comparación con los grupos vacunados (**Figuras 29A y 29C**). Los animales de los grupos vacunados mostraron menor patología en comparación con los animales no vacunados, excepto por el animal N.º 10A del grupo INO-4800X1, que mostró puntuaciones histopatológicas similares a las de los animales no vacunados. Para detectar la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en el tejido pulmonar, se realizó una hibridación *in situ* (ISH). Se observó ARN viral en neumocitos y células inflamatorias

dentro de las lesiones histopatológicas con menor frecuencia en los animales vacunados (**Figura 29B**).

[0428] Se realizaron tomografías computarizadas para proporcionar una medición en vida, no sesgada y cuantificable de la enfermedad pulmonar. Los resultados de tomografías computarizadas de pulmón realizadas 5 días después de la exposición a SARS-CoV-2 se evaluaron para determinar la presencia de características de la enfermedad COVID-19: opacidad en vidrio esmerilado (GGO), consolidación, mosaico de piedra laja, nódulos, consolidación perilobular; distribución: superior, intermedia, inferior, 2/3 centrales, periférica, broncocéntrica, y para émbolos pulmonares. El radiólogo estaba cegado con respecto al estado clínico y el tratamiento del animal. El grado de afectación pulmonar se evaluó y cuantificó con un sistema de puntuación desarrollado para la enfermedad COVID. Los parámetros del sistema de puntuación se proporcionan en la sección de materiales y métodos. Se observaron anomalías pulmonares características de la enfermedad COVID-19 en 3 de 6 y 2 de 6 animales en los grupos de una dosis o dos dosis de INO-4800, respectivamente, y en 5 de 6 animales no vacunados en el grupo de control (se proporcionan imágenes de tomografía computarizada representativas en la **Figura 30**). El grado de afectación pulmonar en los animales con afectación de la enfermedad fue menor de 25 % y se consideró enfermedad de nivel bajo (**Figura 29D**). Hubo una tendencia a que las puntuaciones de enfermedad estén en su punto más alto en el grupo de control no vacunado, con una reducción en los grupos de una dosis y dos dosis de INO-4800 (**Figuras 29E-29G**). La comparación de las puntuaciones entre grupos no alcanzó una diferencia estadística ($p = 0,0584$ entre el grupo con dos dosis de INO-4800 y el grupo no vacunado, prueba de Mann Whitney). Un animal atípico (10A) en el grupo INO-4800 X1 tuvo una puntuación mayor que la de los demás animales. Sin embargo, el nivel de enfermedad aún se consideraba bajo y se había observado una carga comparable de la enfermedad en otros estudios de exposición de NHP a SARS-CoV-2 realizados bajo las mismas condiciones. En resumen, la tomografía computarizada proporciona una medición útil de la enfermedad inducida por SARS-CoV-2 en *Macaca mulatta*. El día 5 posterior a la infección por SARS-CoV-2, las anomalías, si las hubo, se informaron a niveles bajos (<25 % de afectación pulmonar). La evidencia de tomografías computarizadas sugirió tendencias a diferencias en la carga de la enfermedad pulmonar entre los grupos, en donde la carga de la enfermedad era mayor en el grupo de control no vacunado.

[0429] En resumen, después de la exposición a SARS-CoV-2 en dosis alta de

primates no humanos, la carga de la enfermedad se redujo en los animales que recibieron un régimen de dos dosis de la vacuna de INO-4800. No hubo indicios de enfermedad exacerbada por la vacuna, ni siquiera en animales que recibieron un régimen subóptimo de vacunación de una dosis.

[0430] Análisis

[0431] Este ejemplo describe las evaluaciones de seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna de ADN de SARS-CoV-2 INO-4800 en un modelo riguroso de exposición de primates no humanos a una dosis alta. La administración intradérmica de 1 mg de INO-4800 a *Macaca mulatta* induce respuestas tanto humorales como de linfocitos T contra el antígeno espicular de SARS-CoV-2 tanto en un régimen de 2 dosis como en un régimen de 1 dosis. No se registraron eventos clínicos evidentes en los animales a lo largo del estudio. Después de una exposición a una alta dosis de SARS-CoV-2, se observó una reducción de las cargas virales y la carga de la enfermedad pulmonar tanto en el grupo de 1 dosis de vacuna como en el de 2, lo que corrobora la eficacia de INO-4800. Es importante destacar que no se observó una enfermedad exacerbada por la vacuna (VED), ni siquiera en el grupo de 1 dosis.

[0432] El modelo de *Macaca mulatta* se volvió un modelo de amplio uso para evaluar las medidas médicas contra el SARS-CoV-2. Es importante destacar que el SARS-CoV-2 no adaptado de tipo silvestre se replica en el tracto respiratorio de *Macaca mulatta*, y los animales presentes con algunas de las características observadas en seres humanos con síntomas leves de COVID-19 (Salguero, F.J., *et al.*, Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093.; Muñoz-Fontela, C., *et al.*, Animal models for COVID-19. Nature, 2020. 586(7830): p. 509-515). Aquí, el foco está puesto sobre la carga de la enfermedad pulmonar en *Macaca mulatta* expuestos a SARS-CoV-2 que se habían vacunado con INO-4800. Si bien el nivel de carga de la enfermedad pulmonar medido en los animales fue leve, se observó una reducción significativa de las puntuaciones de histopatología y detección viral en los pulmones de animales vacunados (**Figura 29**). Esto sugiere el potencial de un impacto positivo sobre la enfermedad de LRT que se observa en pacientes con COVID-19 que progresan a enfermedad grave. Interesantemente, también se observó una reducción significativa de las cargas virales en el compartimento de la garganta en el tracto respiratorio superior, pero solo una tendencia a la reducción en el compartimento nasal. Puede que exista una inducción diferencial de la inmunidad mucosa en el compartimento faríngeo y el nasal. Curiosamente, se observó una correlación negativa significativa entre los anticuerpos

neutralizantes y dirigidos a RBD en el suero con cargas virales en la garganta, pero no nasales, el día 1 posterior a la exposición (**Figura 15**). Sin embargo, los niveles de estos anticuerpos en cualquiera de estos compartimentos de URT no se evaluaron para proporcionar evidencia adicional de la presencia de mayores niveles de anticuerpos funcionales en la garganta en comparación con las fosas nasales. Otra posibilidad podría ser que el control viral en el compartimento nasal donde se instiló directamente la amplia dosis de exposición a SARS-CoV-2 (5×10^6 pfu) puede ser mayor que en otros compartimentos mucosos. Como sustento de esto, los datos en los animales de control mostraron que los hisopados nasales generaron mayores títulos virales que los hisopados faríngeos, con observaciones similares en sujetos con COVID-19 (Mohammadi, A., *et al.*, SARS-CoV-2 detection in different respiratory sites: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*, 2020. 59: p. 102903).

[0433] Es importante destacar que los datos indicaron que la enfermedad respiratoria exacerbada (ERD) no estuvo asociada con la inmunización con INO-4800 en el régimen de 1 dosis o 2 dosis. En el grupo de una dosis INO-4800 X1, un animal (10A) presentó la mayor puntuación de histopatología pulmonar y la mayor puntuación de tomografía computarizada. Sin embargo, las lesiones multifocales en el animal 10A mostraron un patrón histopatológico similar a los observados en los animales del grupo no vacunado, sin entrada aparente de diferentes subpoblaciones de células inflamatorias en los infiltrados. Una potencial característica distintiva de la enfermedad exacerbada por la vacuna es una mayor afluencia de células inflamatorias tales como eosinófilos [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*, 2011. 85(23): p. 12201-15; Yasui, F., *et al.*, Prior Immunization with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus (SARS-CoV) Nucleocapsid Protein Causes Severe Pneumonia in Mice Infected with SARS-CoV. *The Journal of Immunology*, 2008. 181(9): p. 6337-6348). Se cree que los datos de tomografía computarizada e histopatología del animal 10A no están asociados con ERD, sino con una puntuación y un patrón de la enfermedad similares a los de los animales no vacunados. Se informaron puntuaciones similares de inflamación de histopatología pulmonar que iban de mínima-leve a leve-moderada en muestras analizadas 7 u 8 días después de la exposición en *Macaca mulatta* que recibieron otros candidatos a vacuna [Corbett, K.S., *et al.*, Evaluation of the mRNA- 1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *New England Journal of Medicine*, 2020. 383(16): p. 1544-1555).

Actualmente, VED sigue siendo una preocupación teórica con la vacunación contra SARS-CoV-2 y los intentos de inducir la exacerbación de la enfermedad con el uso de una preparación de virus entero inactivada con formalina de SARS-CoV-2 no han logrado repetir la patología pulmonar informada anteriormente para otras vacunas virales respiratorias inactivadas (Bewley, K.R., *et al.*, Immunological and pathological outcomes of SARS-CoV-2 challenge after formalin-inactivated vaccine immunization of ferrets and rhesus macaques. 2020: p. 2020.12.21.423746).

[0434] Estos datos complementan el estudio de exposición de NHP a SARS-CoV-2 que demostró la reducción en cargas virales de LRT varios meses después de la inmunización con INO-4800 (Ejemplo 9). Sin embargo, hay claras diferencias entre los estudios, que incluyen las diferentes dosis y variantes usadas para la reserva usada para la exposición, y el momento de la exposición. En el estudio descrito en este ejemplo, el animal se expuso cuatro semanas después de la última vacunación, en un punto temporal en el que había altos niveles de anticuerpos neutralizantes en circulación. En el otro estudio, el nivel de anticuerpos neutralizantes de SARS-CoV-2 en suero fue bajo al momento de la exposición, la protección pareció depender de que se recuerde una respuesta de memoria, y se detectó en los animales una fuerte respuesta humoral y celular contra el antígeno espicular de SARS-CoV-2. Aquí no se observó una respuesta anamnésica de magnitud similar, lo que sugiere que la protección puede haber estado mediada por los anticuerpos presentes en la circulación al momento de la exposición, lo cual encuentra sustento en la correlación entre los niveles de anticuerpos dirigidos a SARS-CoV-2 en suero y las reducciones de las cargas virales (**Figura 15**).

[0435] En conclusión, estos resultados de un modelo animal con SARS-CoV-2 preclínico exhaustivo sustentan adicionalmente la eficacia y seguridad de la vacuna de ADN INO-4800 como una medida profiláctica contra COVID-19. Es importante destacar que, evaluada como inmunización de una sola dosis, se observó un impacto positivo sobre la carga de la enfermedad pulmonar y nada de VED. En conjunto con los datos clínicos de INO-4800, INO-4800 tiene muchos atributos en lo que respecta a la seguridad, eficacia y viabilidad logística debido a su alta estabilidad, que niega la necesidad de una compleja distribución con cadena de frío para su acceso global. Además, la tecnología de vacunas de ADN sintético puede aplicarse con cronogramas de desarrollo altamente acelerados, lo que permite un diseño y una evaluación rápidos de los candidatos contra nuevas variantes de SARS-CoV-2 que presentan potencial de escape inmunitario (Wibmer, C.K., *et al.*, SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization

by South African COVID-19 donor plasma. 2021: p. 2021.01.18.427166.; Moore, J.P. y P.A. Offit, SARS-CoV-2 Vaccines and the Growing Threat of Viral Variants. JAMA, 2021).

[0436] EJEMPLO 9 La vacuna de ADN de SARS-COV-2 induce inmunidad humoral y celular, lo que da como resultado respuestas de memoria que proporcionan protección anamnésica en una exposición de *Macaca mulatta*

[0437] La inmunogenicidad de una vacuna de ADN sintético que codifica la proteína espicular de SARS-CoV-2 se demostró anteriormente tanto en ratones como en cobayos (Ejemplo 1). En este ejemplo, se demuestra la durabilidad de las respuestas inmunitarias inducidas por INO-4800 en *Macaca mulatta*. La administración ID-EP en *Macaca mulatta* indujo respuestas celulares y humorales a la proteína S de SARS-Cov-2, con reactividad cruzada adicional con la proteína S de SARS-CoV-1. La eficacia protectora se demuestra más de 3 meses después de la inmunización final, lo que demuestra el establecimiento de respuestas inmunitarias anamnésicas y menores cargas virales en los macacos vacunados. Tras la exposición viral, se observó una reducción de las cargas virales en BAL de ARN mensajero subgenómico (sgmARN) en comparación con los animales de control con 1 mg (1/5 de la dosis de ADN) administrado por vía intradérmica (ID). Esto estaba asociado con la inducción de una rápida respuesta de memoria en los brazos inmunitarios celular y humoral, lo que corrobora el potencial de moderación de la enfermedad del candidato INO-4800. No se observaron eventos adversos o evidencia de enfermedad exacerbada por la vacuna (VED) en los animales del grupo vacunado. Se observaron cargas menores de ARN subgenómico viral en el pulmón inferior y VL inferior. Se observó una tendencia de VL menor en la nariz. Estos datos sustentan que la inmunización con este candidato a vacuna de ADN limita la replicación viral activa y tiene el potencial de reducir la gravedad de la enfermedad, así como la diseminación viral en la cavidad nasal.

[0438] Es importante destacar que las cargas virales iniciales detectadas en los animales de control de este estudio fueron en promedio 1-2 unidades logarítmicas mayores (10^9 PFU/hisopado en 4/5 NHP el día 1 posterior a la exposición) que en estudios publicados similares realizados en condiciones idénticas ($\sim 10^7$ PFU/hisopado) (Yu *et al.*, 2020, Science, eabc6284). Solo dos de los estudios con NHP informados anteriormente incluían la administración intranasal como vía de inoculación para la exposición (van Doremalen *et al.*, 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu *et al.*, 2020, Science, eabc6284). Se emplean frecuentemente inóculos de exposición a dosis alta para garantizar el establecimiento de la infección, aunque los sistemas no letales, tales

como este modelo de *Macaca mulatta* con SARS-CoV-2, pueden reducir artificialmente el impacto de las vacunas e intervenciones potencialmente protectoras (Durudas *et al.*, 2011, Curr HIV Res 9, 276-288; Innis *et al.*, 2019, Vaccine 37, 4830-4834). A pesar de estas limitaciones, este estudio demostró una reducción significativa del sgRNA de BAL máximo y el ARN viral total, inducida probablemente por la rápida inducción de la memoria inmunológica mediada por los compartimentos de linfocitos B y T. Wolfel *et al.* informó títulos nasales en pacientes con un promedio de $6,5 \times 10^5$ copias/hisopado 1-5 días después del inicio de los síntomas (Wolfel *et al.*, 2020, Nature 581, 465-469). Estos títulos son significativamente menores que la dosis de exposición y sustentan el potencial de un control temprano por parte del candidato a vacuna durante la infección por SARS-CoV-2.

[0439] Este estudio muestra que una vacunación de ADN con un candidato a vacuna que se dirige a la proteína espicular de SARS-CoV-2 de longitud completa aumenta probablemente la disponibilidad de epítomos inmunodominantes de linfocitos T, lo que conduce a una respuesta inmunitaria más amplia y potente, en comparación con los dominios parciales y los inmunógenos truncados. En este estudio se observó reactividad cruzada de los linfocitos T con SARS-CoV-1.

[0440] Además de los linfocitos T, INO-4800 indujo respuestas de anticuerpos duraderas que aumentaron rápidamente tras la exposición a SARS-CoV-2. Se demuestra adicionalmente que INO-4800 indujo robustas respuestas de anticuerpos neutralizantes tanto contra la variante de SARS-CoV-2 D614 como contra su variante G614. Si bien el sitio D/G 614 está fuera del RBD, se ha sugerido que este cambio tiene el potencial de afectar los anticuerpos generados por la vacuna (Korber B *et al.*, 2020, Cell 182:1–16). Otros estudios informan que la variante G614 exhibe mayor infectividad de SARS-CoV-2 (Hu *et al.*, 2020, bioRxiv 2020.06.20.161323; Ozono S, 2020, bioRxiv 2020.06.15.151779). Los datos muestran una inducción de títulos de neutralización comparables entre las variantes D614 y G614 y que estas respuestas son generadas de manera similar después de la exposición a SARS-CoV-2.

[0441] Materiales y métodos

[0442] ELISpot de IFN γ , ELISA e inmunizaciones de primates no humanos

[0443] *Vacuna de ADN, INO-4800*: La secuencia de ADN altamente optimizada que codifica la proteína espicular IgE de SARS CoV-2 se creó con el algoritmo de optimización génica *in silico* propiedad de Inovio para mejorar la expresión y la inmunogenicidad (Smith *et al.*, 2020, Nat Commun 11, 2601). La secuencia de ADN optimizada se sintetizó, se digirió con BamHI y XhoI, y se clonó en el vector de

expresión pGX0001 bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano y una señal de poliadenilación de una hormona de crecimiento bovina.

[0444] Animales: Todos los experimentos con *Macaca mulatta* fueron aprobados por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de Bioqual (Rockville, Maryland), una instalación acreditada internacionalmente por la Asociación para la evaluación y acreditación para el cuidado de animales de laboratorio (AAALAC). Se recolectó sangre para química sanguínea, aislamiento de PBMC y análisis serológico. Se recolectó BAL en la semana 8 para evaluar los niveles pulmonares de anticuerpos y en los días 1, 2, 4, 7 posteriores a la exposición para evaluar las cargas virales en los pulmones.

[0445] Inmunizaciones, recolección de muestras y exposición viral. Diez *Macaca mulatta* chinos (con un peso de 4,55kg-5,55kg) se asignaron aleatoriamente a un grupo inmunizado (3 machos y 2 hembras) o un grupo sin tratamiento (2 machos y 3 hembras) del estudio. Los macacos inmunizados recibieron dos inyecciones de 1 mg de la vacuna de ADN de SARS-CoV-2, INO-4800, en las semanas 0 y 4 mediante administración ID-EP con el dispositivo CELLECTRA 2000® Adaptive Constant Current Electroporation Device con una matriz 3P (Inovio Pharmaceuticals). Se recolectó sangre en los puntos temporales indicados para analizar la química sanguínea y el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y se recolectó suero para realizar un análisis serológico. Se recolectó un lavado broncoalveolar en la semana 8 para evaluar los niveles pulmonares de anticuerpos. BAL de animales sin tratamiento previo se usó como control. En la semana 17, todos los animales se expusieron a $1,2 \times 10^8$ VP ($1,1 \times 10^4$ PFU) de SARS-CoV-2. El virus se administró a razón de 1 ml por vía intranasal (IN) (0,5 ml en cada fosa nasal) y 1 ml por vía intratraqueal (IT).

[0446] Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica. Se recolectó sangre de cada macaco en tubos de preparación celular (CPT, BD Biosciences) con citrato de sodio. Los tubos se centrifugaron para separar el plasma y los linfocitos, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se transportaron mediante envío el mismo día sobre compresas frías de Bioqual a The Wistar Institute para el aislamiento de PBMC. Se lavaron las PBMC se lavaron y se eliminaron los glóbulos rojos residuales con amortiguador de lisis de amonio-cloruro-potasio (ACK). Las células se contaron con un contador ViCell (Beckman Coulter) y se volvieron a suspender en RPMI 1640 (Corning), complementado con 10 % de suero bovino fetal

(Atlas) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células frescas luego se colocaron en placas para ensayos de ELISpot de IFN γ y citometría de flujo.

[0447] Immunospot ligado a enzimas (ELISpot) de IFN- γ . Se realizó un ensayo de ELISpot de interferón gamma (IFN- γ) de mono para detectar las respuestas celulares. Placas con ELISpotPro (fosfatasa alcalina) de IFN- γ de mono (Mabtech, Sweeden, N.º de cat. 3421M-2APW-10) se bloquearon por un mínimo de 2 horas con RPMI 1640 (Corning), complementado con 10 % de FBS y 1 % de pen/estrep (R10). Tras el aislamiento de PBMC, se agregaron 200,000 células de macacos a cada cavidad en presencia de 1) grupos de péptidos superpuestos (15-meros con superposición de 9-meros) correspondientes a las proteínas espiculares de SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 o MERS-CoV (concentración final de 5 μ g/ml/cavidad), 2) R10 con DMSO (control negativo), o 3) control positivo anti-CD3 (Mabtech, dilución de 1:1000). Todas las muestras se colocaron en placas por triplicado. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de 18-20 horas, las placas se lavaron en PBS y aparecieron manchas de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se tomaron imágenes de las manchas con un lector de placas CTL Immunospot y se determinaron las respuestas específicas del antígeno al sustraer la cantidad de manchas en la cavidad de control negativo de R10+DMSO de las cavidades estimuladas con grupos de péptidos.

[0448] ELISA de unión al antígeno. Se recolectaron suero y BAL en cada punto temporal y se los evaluó de la manera indicada para determinar los títulos de unión. Placas inmunoabsorbentes de noventa y seis cavidades (NUNC) se recubrieron con 1 μ g/ml de proteína de ECD S1+S2 (Sino Biological 40589-V08B1), proteína S1 (Sino Biological 40591-V08H), proteína S2 (Sino Biological 40590-V08B) o proteína de dominio de unión al receptor (RBD) (Sino Biological 40595-V05H) de SARS-CoV-2 recombinante en DPBS durante la noche a 4 °C. Placas de ELISA también se recubrieron con 1 μ g/ml de proteína S1 (Sino Biological 40150-V08B1) y proteína de RBD (Sino Biological 40592-V08B) de SARS-CoV recombinante o proteína espicular de MERS-CoV (Sino Biological 40069-V08B). Las placas se lavaron cuatro veces con PBS + 0,05 % de Tween20 (PBS-T) y se bloquearon con 5 % de leche descremada en PBS-T (5 % de SM) durante 90 minutos a 37 °C. Los sueros o BAL de macacos vacunados con INO-4800 se diluyeron en serie en 5 % de SM, se agregaron a las placas de ELISA lavadas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBS-T y un anti-IgG de mono conjugado con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotech 4700-5). Las placas se lavaron 4

veces con PBS-T y se agregó una solución de TMB de una etapa (Sigma) a las placas. La reacción se detuvo con un volumen igual de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron a 450 nm y 570 nm dentro de los 30 minutos posteriores al desarrollo con un lector de placas Biotek Synergy2.

[0449] ELISA de competencia con ACE2-Primates no humanos. Placas de media área y 96 cavidades (Corning) se recubrieron a temperatura ambiente durante 3 horas con 1 µg/ml de anticuerpo anti-His PolyRab (ThermoFisher, PA1-983B), seguido de bloqueo durante la noche con amortiguador de bloqueo que contenía 1x PBS, 5 % de leche descremada, 1 % de FBS y 0,2 % de Tween-20. Las placas luego se incubaron con 10 µg/ml de SARS-CoV-2 etiquetado con His6x ("His6x" divulgado como SEQ ID NO: 25), ECD S1+S2 (Sinobiological, 40589-V08B1) a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Los sueros de NHP (día 0 o semana 6) se diluyeron en serie 3 veces con 1XPBS que contenía 1 % de FBS y 0,2 % de Tween y se premezclaron con huACE2-IgMu a una concentración constante de 0,4 µg/ml. La premezcla luego se agregó a la placa y se incubó a RT durante 1-2 horas. Las placas se incubaron adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora con H+L HRP anti-IgG de ratón en cabra (A90-116P, Bethyl Laboratories) a una dilución de 1:20,000, seguido de la adición de TMB Ultra Substrate (ThermoFisher) de una etapa y luego inactivación con H₂SO₄ 1M. La absorbancia a 450 nm y 570 nm se registró con el lector de placas BioTEK.

[0450] Ensayo de inhibición de la unión al receptor de ACE2 a base de citometría de flujo. Se generaron linfocitos HEK-293T que expresan de manera estable ACE2-GFP mediante transducción retroviral. Tras la transducción, las células se clasificaron por flujo según la expresión de GFP para aislar las células GFP positivas. Se realizó la clonación unicelular de estas células para generar líneas celulares con una expresión equivalente de ACE2-GFP. Para detectar la inhibición de la unión de la proteína espicular a ACE2, se incubó la proteína de ECD S1+S2 etiquetada con his (Sino Biological, N.º de catálogo 40589-V08B1) con suero recolectado de animales vacunados en los puntos temporales indicados y a las diluciones indicadas a una concentración de 2,5 µg/ml sobre hielo durante 60 minutos. Esta mezcla luego se transfirió a 150,000 linfocitos 293T-ACE2-GFP y se incubó sobre hielo durante 90 minutos. Tras esto, las células se lavaron 2x con PBS seguido de tinción para la detección de anticuerpo anti-his conjugado con APC Surelight® (Abcam, ab72579) durante 30 min sobre hielo. Como un control positivo, la proteína espicular se preincubó con ACE2 humana recombinante antes de transferirla a linfocitos 293T-Ace2-GFP. Los datos se adquirieron con un BD LSRII y se analizaron con FlowJo

(versión 10).

[0451] Ensayo de neutralización de pseudovirus. Se produjeron pseudovirus SARS-CoV-2 con el uso de linfocitos HEK293T transfectados con GeneJammer (Agilent) mediante el uso de plásmido S de IgE-SARS-CoV-2 (Genscript) y plásmido pNL4-3.Luc.R-E- (reactivo de SIDA de NIH) a una relación de 1:1. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recolectó el sobrenadante de la transfección, se lo enriqueció con FBS hasta un volumen final de 12 %, se lo filtró de manera estéril (Millipore Sigma) y se lo dividió en alícuotas para su almacenamiento a -80 °C. Se preparó un ensayo de neutralización de pseudovirus SARS-Cov-2 con medio D10 (DMEM complementado con 10 % de FBS y 1X de penicilina-estreptomicina) en un formato de 96 cavidades. Se usaron células CHO que expresan de manera estable Ace2 como células diana (Creative Biolabs, N.º de catálogo VCeL-Wyb019). Se titularon los pseudovirus SARS-Cov-2 para generar más de 20 veces la cantidad de unidades de luminiscencia relativa (RLU) de control solo de células después de 72 h de infección. Para preparar el ensayo de neutralización, 10,000 células CHO-ACE2 se colocaron en placas de 96 cavidades en 100 µL de medio D10 y se dejó que reposen durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. El día siguiente, sueros de mono y conejo de grupos vacunados con INO-4800 y de control se inactivaron por calor y se diluyeron en serie de la manera deseada. Los sueros se incubaron con una cantidad fija de pseudovirus SARS-Cov-2 durante 90 minutos a RT. Se retiraron 50 µL de medio de las cavidades que contenían células CHO-Ace2 colocadas en placas. Después de 90 minutos, la mezcla se agregó a las células CHO-Ace2 colocadas en placas y se permitió su incubación en una incubadora estándar (37 % de humedad, 5 % de CO₂) durante 72 h. Después de 72 h, las células se lisaron con el uso del sistema de ensayo del gen indicador de luminiscencia britelite plus (Perkin Elmer N.º de catálogo 6066769) y las RLU se midieron con el lector de placas Biotek. Se calcularon los títulos de neutralización (ID₅₀) con GraphPad Prism 8 y se los definió como la dilución de suero recíproca a la que las RLU se redujeron 50 % en comparación con las RLU en las cavidades de control de virus después de sustraer las RLU de fondo en cavidades de control celular.

[0452] Ensayo de ARN viral. Se utilizaron ensayos de RT-PCR para monitorear las cargas virales, esencialmente de la manera descrita anteriormente (Abnink P *et al.* 2019 Science). Sucintamente, se extrajo ARN con un QIAcube HT (Qiagen, Alemania) y el kit Cador Pathogen HT Kit de sobrenadante de lavado broncoalveolar (BAL) e hisopados nasales. El ARN se transcribió de manera inversa con SuperScript VILO

(Invitrogen) y se ejecutó por duplicado con QuantStudio 6 y 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se calcularon las cargas virales de copias de ARN viral por ml o por hisopado y la sensibilidad del ensayo fue de 50 copias. La diana para la amplificación fue el gen N (nucleocápside) de SARS-CoV2. Los cebadores y las sondas para las dianas fueron los siguientes: 2019-nCoV_N1-F:5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3' (SEQ ID NO: 18); 2019-nCoV_N1-R: 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (SEQ ID NO: 19); 2019- nCoV_N1-P: 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3' (SEQ ID NO: 20).

[0453] Ensayo de mRNA subgenómico. Se evaluó el mRNA subgenómico (sgmARN) del gen E de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR con un enfoque similar al descrito anteriormente (Wolfel R., *et al.* 2020, Nature, 581, 465-469). Para generar una curva estándar, el sgmARN del gen E de SARS-CoV-2 se clonó en un plásmido de expresión pcDNA3.1; esta inserción se transcribió con un kit AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (Cellscript) para obtener ARN para los estándares. Antes de la RT-PCR, las muestras recolectadas de estándares o animales expuestos se transcribieron de manera inversa con Superscript III VILO (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diseñó un ensayo personalizado de expresión génica Taqman (ThermoFisher Scientific) con el uso de las secuencias dirigidas al sgmARN del gen E (18). Las reacciones se llevaron a cabo en QuantStudio 6 y 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se usaron curvas estándar para calcular el sgmARN en copias por ml o por hisopado; la sensibilidad del ensayo cuantitativo fue de 50 copias por ml o por hisopado.

[0454] Resultados

[0455] Inducción de respuestas inmunitarias humores y celulares de memoria en primates no humanos inmunizados con INO-4800. Los primates no humanos (NHP) son un modelo valioso en el desarrollo de vacunas y tratamientos contra el COVID-19 ya que se los puede infectar con SARS-CoV-2 de tipo silvestre y presentan una patología similar a la de los seres humanos (Chandrashekar *et al.*, 2020, Science, eabc4776; Qin *et al.*, 2005, J Pathol 206, 251-259; Yao *et al.*, 2014, J Infect Dis 209, 236-242; Yu *et al.*, 2020, Science, eabc6284). Los *Macaca mulatta* (n=5) recibieron dos inmunizaciones de INO-4800 (1 mg), en la semana 0 y la semana 4 (**Figura 33A**). Los animales de control sin tratamiento previo (n=5) no recibieron vacuna. Las respuestas inmunitarias humores y celulares se monitorearon durante 15 semanas

(~4 meses) tras la inmunización principal para respuestas de memoria. Todos los animales se seroconvirtieron después de una sola inmunización con INO-4800, y se detectaron títulos de IgG en suero contra las regiones de dominio extracelular (ECD) S1+S2 de longitud completa, S1, S2 y RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 (**Figura 33B y Figura 33C**). También se detectaron anticuerpos con reactividad cruzada contra la proteína S1 de SARS-CoV y RBD, pero no MERS-CoV (**Figura 34**). Se detectó IgG reactiva con SARS-CoV-2 contra el ECD y el RBD en lavados broncoalveolares (BAL) en la semana 8 posterior a la inmunización (**Figura 34**).

[0456] En las muestras de suero de los animales, se detectó actividad de neutralización de pseudovirus SARS-CoV-2 durante >4 meses tras la inmunización (**Figura 33D**), lo que demuestra títulos de memoria comparables a los observados en otros estudios informados de protección aguda en macacos (Gao *et al.*, 2020, Science 369, 77-81; Tian *et al.*, 2020, Emerg Microbes Infect, 9:382-385; van Doremalen *et al.*, 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu *et al.*, 2020, Science, eabc6284) y estudios informados para humanos convalecientes (Ni *et al.*, 2020, Immunity 52, 971-977 e973; Robbiani *et al.*, 2020, Nature, s41586-020-2456-9). Durante la pandemia de COVID-19, surgió una variante espicular de D614G SARS-CoV-2 que tiene potencialmente mayor infectividad y representa ahora >80 % de los nuevos aislados (Korber B *et al.*, 2020, Cell 182:1–16). Hay preocupación de que las vacunas desarrolladas antes de la aparición de esta variante no puedan neutralizar el virus D614G. Por lo tanto, se evaluó la neutralización contra esta nueva variante con un pseudovirus modificado que expresaba la proteína espicular G614 (**Figura 33E**). Se observaron títulos de ID50 con neutralización similar tanto contra la proteína espicular D614 como contra la proteína espicular G614, lo que sustenta la inducción de respuestas de anticuerpos funcionales por INO-4800 contra la variante de SARS-CoV-2 ahora prevalente.

[0457] Para investigar adicionalmente las actividades de neutralización, los sueros también se evaluaron con un ELISA de competencia con ACE2, donde los sueros de 80 % de los NHP inmunizados inhibieron la interacción entre la proteína espicular de SARS-CoV-2 y ACE2 (**Figura 33F**). 100 % de los macacos respondieron en el ensayo de inhibición de ACE2-293T por citometría de flujo, con una inhibición de 53-96 % de la interacción entre antígeno espicular y ACE2 a una dilución de 1:10 y una inhibición de 24-53 % a una dilución de 1:30 (**Figura 33G**).

[0458] La inmunización con INO-4800 también indujo respuestas de linfocitos T reactivos con el antígeno S de SARS-CoV-2 contra los 5 grupos de péptidos, en donde las respuestas de linfocitos T llegaron a su máximo en la semana 6, dos semanas

después de la segunda inmunización (0-518 SFU/millón de células) (**Figura 33H**). Se detectaron distintas

respuestas de epítomos inmunogénicos contra las regiones S2 y RBD (**Figura 33B**). También se detectaron respuestas de linfocitos T de reactividad cruzada contra la proteína espicular de SARS-CoV (**Figura 36A**). Sin embargo, no se observó reactividad cruzada con péptidos espiculares de MERS-CoV, lo que corrobora la menor homología de secuencia entre SARS-CoV-2 y MERS-CoV (**Figura 36B**).

[0459] Respuestas de recuperación de la memoria inducidas por la vacuna tras la exposición a SARS-CoV-2 en primates no humanos. Los macacos inmunizados con vacuna y los controles no vacunados se expusieron a SARS-CoV-2 13 semanas (~3 meses) después de la inmunización final (semana 17 del estudio, **Figura 37A**). Los NHP recibieron una dosis de exposición de $1,1 \times 10^4$ PFU de aislado de SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 mediante inoculación intranasal e intratraqueal como se describió anteriormente (Chandrashekar *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). Tras la exposición viral, 3/5 de animales vacunados con INO-4800 tuvieron un aumento inmediato de los títulos de anticuerpos contra el ECD de longitud completa de SARS-CoV-2. Para el día 7, 5/5 animales tenían un aumento de los títulos de anticuerpos tanto contra RBD como contra el ECD de longitud completa (**Figura 37B**). Siete días después de la exposición, se observó una robusta media geométrica de los títulos de valoración de 409.600 – 1.638.400 en los animales inmunizados, en comparación con el grupo sin tratamiento previo que presentó una seroconversión de solo 1/5 animales (GMT 100) (**Figura 37B**). Se observó un aumento significativo de los títulos de pseudoneutralización en todos los animales inmunizados con INO-4800 tanto contra la variante de la proteína espicular D614 como contra su variante G614 7 días después de la exposición (**Figura 37C**).

[0460] Se evaluaron las respuestas celulares antes y después de la exposición. Para la semana 15, las respuestas de ELISpot de IFN- γ habían disminuido significativamente desde las respuestas máximas observadas en la semana 6. Las respuestas de los linfocitos T aumentaron en el grupo vacunado después de la exposición (~218,36 SFU/millón de células), lo que implica recuperación de la memoria de los linfocitos T inmunológicos (**Figura 38 y Figura 39**).

[0461] Eficacia protectora tras la exposición a SARS-CoV-2. En puntos temporales más tempranos tras la entrada del virus al momento de la exposición, la detección de mRNA viral no discrimina entre el inóculo de exposición ingresado y la infección activa, mientras que es más probable que los niveles de sgRNA sean representativos de la

replicación celular activa de SARS-CoV-2 (Wolfel *et al.*, 2020, Nature, 581, 465-469; Yu *et al.*, 2020, Science, eabc6284). Se midió el mRNA subgenómico (sgmARN) de SARS-CoV-2 en macacos de control no vacunados y macacos vacunados con INO-4800 tras la exposición a $1,1 \times 10^4$ PFU del aislado de SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 (**Figura 40**). Las cargas máximas de sgmARN viral en el BAL fueron significativamente menores en el grupo vacunado con INO-4800 (Figura 40A y Figura 40B), junto con cargas de ARN viral significativamente menores el día 7 posterior a la exposición (**Figura 40C**), lo que indica protección de la enfermedad respiratoria inferior. Si bien se detectó sgmARN en los hisopados nasales tanto de los animales de control como de los animales vacunados con INO-4800 (**Figuras 40D a 40F**), los niveles de ARN viral mostraron una tendencia a la baja en animales vacunados con INO-4800 a razón de más de 2 unidades logarítmicas (**Figura 40F**). En general, las menores cargas virales obtenidas mediante la vacunación con INO-4800 se deben probablemente a respuestas anamnésicas de linfocitos B y T que se recuerdan rápidamente tras la exposición a una infección por SARS-CoV-2.

[0462] Se entiende que la descripción detallada anterior y los ejemplos adjuntos son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones sobre el alcance de la invención, que está definido solo por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

[0463] Diversos cambios y modificaciones a las formas de realización divulgadas serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio. Tales cambios y modificaciones, que incluyen, entre otros, los relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermediarios, síntesis, composiciones, formulaciones o métodos de uso de la invención, pueden realizarse sin apartarse del espíritu y el alcance de esta.

[0464] FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[0465] Forma de realización 1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno espicular de coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), en donde la molécula de ácido nucleico comprende:

una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de la secuencia de ácidos nucleicos establecida en los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2;

una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 2;

la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2; la

secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2;
una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 3;
la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3;
una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5;
una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 5;
la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5;
una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 6; o
la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.

[0466] Forma de realización 2. Una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno espicular de SARS-CoV-2, en donde el antígeno espicular de SARS-CoV-2 comprende:

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1;
la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1;
una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1;
la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4;
una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0467] Forma de realización 3. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o la forma de realización 2.

[0468] Forma de realización 4. El vector de expresión de acuerdo con la forma de realización 3, en donde la molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a un elemento regulador seleccionado de un promotor y una señal de poliadenilación.

[0469] Forma de realización 5. El vector de expresión de acuerdo con la forma de realización 3 o la forma de realización 4, en donde el vector es un plásmido o vector

viral.

[0470] Forma de realización 6. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad eficaz del vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5.

[0471] Forma de realización 7. La composición inmunogénica de acuerdo con la forma de realización 6, que comprende además un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0472] Forma de realización 8. La composición inmunogénica de acuerdo con la forma de realización 7, en donde el excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico comprende un amortiguador, opcionalmente un amortiguador de solución salina-citrato de sodio.

[0473] Forma de realización 9. La composición inmunogénica de acuerdo con la forma de realización 8, en donde la composición se formula a una concentración de 10 mg por mililitro de un amortiguador de citrato de sal de sodio.

[0474] Forma de realización 10. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-9, que comprende además un adyuvante.

[0475] Forma de realización 11. Un antígeno espicular de SARS-CoV-2 que comprende:

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1;

la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1;

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1;

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4;

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4;

la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4;

o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0476] Forma de realización 12. Una vacuna para la prevención o el tratamiento de una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) que comprende una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5 o el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11.

[0477] Forma de realización 13. La vacuna de acuerdo con la forma de realización 12, que comprende además un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0478] Forma de realización 14. La vacuna de acuerdo con la forma de realización 13, en donde el excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico comprende un amortiguador, opcionalmente un amortiguador de citrato de sal de sodio.

[0479] Forma de realización 15. La vacuna de acuerdo con la forma de realización 14, formulada a una concentración de 10 mg de ácido nucleico por mililitro de un amortiguador de citrato de sal de sodio.

[0480] Forma de realización 16. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12 a 15, que comprende además un adyuvante.

[0481] Forma de realización 17. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 al sujeto.

[0482] Forma de realización 18. Un método para proteger a un sujeto que lo necesite de una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 al sujeto.

[0483] Forma de realización 19. Un método para proteger a un sujeto que lo necesite de una enfermedad o trastorno asociado con una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 al sujeto.

[0484] Forma de realización 20. Un método para tratar a un sujeto que lo necesite contra una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 al sujeto, en donde el sujeto se vuelve así resistente a una o más cepas de SARS-CoV-2.

[0485] Forma de realización 21. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 17 a 20, en donde la administración comprende al menos una de electroporación e inyección.

[0486] Forma de realización 22. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 17 a 20, en donde la administración comprende administración parenteral seguida de electroporación.

[0487] Forma de realización 23. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 17 a 22, en donde se administra al sujeto una dosis inicial de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico, opcionalmente en donde la dosis inicial es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0488] Forma de realización 24. El método de acuerdo con la forma de realización 23, en donde se administra al sujeto una dosis posterior de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico alrededor de cuatro semanas después de la dosis inicial, opcionalmente en donde la dosis posterior es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0489] Forma de realización 25. El método de acuerdo con la forma de realización 24, en donde se administra al sujeto una o más dosis posteriores adicionales de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico al menos doce semanas después de la dosis inicial, opcionalmente en donde la dosis posterior adicional es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0490] Forma de realización 26. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 17 a 25, que comprende administrar INO-4800 o un biosimilar de este al sujeto.

[0491] Forma de realización 27. El método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 17 a 26, que comprende además administrar al sujeto al menos un agente adicional para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o

la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una infección por SARS-CoV-2.

[0492] Forma de realización 28. El método de acuerdo con la forma de realización 27, en donde la molécula de ácido nucleico, el vector, la composición inmunogénica, el antígeno o la vacuna se administra al sujeto antes o después del agente adicional, o concurrentemente con este.

[0493] Forma de realización 29. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) en un sujeto que lo necesite.

[0494] Forma de realización 30. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 en un método para proteger a un sujeto de una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

[0495] Forma de realización 31. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 en un método para proteger a un sujeto de una enfermedad o trastorno asociado con una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

[0496] Forma de realización 32. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5, la composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 6-10, el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 o la vacuna de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 12-16 en un método para tratar a un sujeto que lo necesite contra una infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

[0497] Forma de realización 33. El uso de acuerdo con cualquiera de las formas de

realización 29 a 32 en combinación con al menos un agente adicional para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 o el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una infección por SARS-CoV-2.

[0498] Forma de realización 34. El uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29 a 33, en donde la molécula de ácido nucleico, el vector, la composición inmunogénica, el antígeno o la vacuna se administra al sujeto mediante al menos una de electroporación e inyección.

[0499] Forma de realización 35. El uso de acuerdo con la forma de realización 34, en donde la molécula de ácido nucleico, el vector, la composición inmunogénica, el antígeno o la vacuna se administra al sujeto por vía parenteral, seguido de electroporación.

[0500] Forma de realización 36. El uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29 a 35, en donde se administra al sujeto una dosis inicial de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico, opcionalmente en donde la dosis inicial es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0501] Forma de realización 37. El uso de acuerdo con la forma de realización 36, en donde se administra al sujeto una dosis posterior de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico alrededor de cuatro semanas después de la dosis inicial, opcionalmente en donde la dosis posterior es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0502] Forma de realización 38. El uso de acuerdo con la forma de realización 37, en donde se administra al sujeto una dosis posterior adicional de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 2,0 mg de ácido nucleico al menos doce semanas después de la dosis inicial, opcionalmente en donde la dosis posterior adicional es de 0,5 mg, 1,0 mg o 2,0 mg de ácido nucleico.

[0503] Forma de realización 39. El uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29 a 38, en donde la composición inmunogénica es INO-4800 o un biosimilar de este.

[0504] Forma de realización 40. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5 o el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 en la preparación de un medicamento.

[0505] Forma de realización 41. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5 o el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 en la

preparación de un medicamento para tratar o proteger contra la infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

[0506] Forma de realización 42. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 3-5 o el antígeno de acuerdo con la forma de realización 11 en la preparación de un medicamento para proteger a un sujeto que lo necesite de una enfermedad o trastorno asociado con la infección por coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2).

[0507] Forma de realización 43. Un método para detectar una respuesta inmunitaria celular persistente en un sujeto, en donde el método comprende las etapas de:

administrar una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno SARS-CoV-2 a un sujeto que lo necesite;

aislar células mononucleares periféricas (PBMC) del sujeto;

estimular las PBMC aisladas con un antígeno espicular de SARS-CoV-2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos 19 a 1279 de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y un fragmento de esta que comprende al menos 20 aminoácidos; y

detectar al menos una de la cantidad de células que expresan citocinas y el nivel de expresión de citocinas.

[0508] Forma de realización 44. El método de acuerdo con la forma de realización 43, en donde la etapa de detectar al menos una de la cantidad de células que expresan citocinas y el nivel de expresión de citocinas se realiza mediante el uso de un ensayo seleccionado del grupo que consiste en análisis Immunospot ligado a enzimas (ELISpot) y tinción de citocinas intracelulares (ICS) con citometría de flujo.

[0509] Forma de realización 45. El método de acuerdo con la forma de realización 43, en donde al sujeto se le administra una composición inmunogénica que comprende una molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de la secuencia de ácidos nucleicos establecida en los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2;
- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 2;
- la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 2; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2;
- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 3;
- la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3;
- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5;
- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 5;
- la secuencia de ácidos nucleicos de los nucleótidos 55 a 3837 de SEQ ID NO: 5; la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5;
- una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor de 90 % de identidad a lo largo de una longitud completa de SEQ ID NO: 6; y
- la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.

[0510] LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia de inserción de aminoácidos de antígeno espicular de consenso de SARS-CoV-2 de pGX9501 (SEQ ID NO: 1) (secuencia líder de IgE subrayada):

1	<u>MDWTWILFLV</u>	<u>AAATRVHSSQ</u>	CVNLTTTRTQL	PPAYTNSFTR	GVYYPDKVFR	SSVLHSTQDL
61	FLPFFSNVTW	FHAIHVSGTN	GTRKFDNPVL	PFNDGVYFAS	TEKSNIIRGW	IFGTTLDSTK
121	QSLIVNNAT	NVVIKVCEFQ	FCNDPFLGVY	YHKNNKSWMESEFRVYSSAN	NCTFEYVSQP	
181	FLMDLEGKQG	NFKNLREFVF	KNIDGYFKIY	SKHTPINLVR	DLPQGFSALE	PLVDLPIGIN
241	ITRFQTLLAL	HRSYLTPGDS	SSGWTAGAAA	YYVGYLQPR	FLLKYNENGT	ITDAVDCALD
301	PLSEKCTLK	SFTVEKGIYQ	TSNFRVQPT	SIVRFPNITN	LCPFGEVFNA	TRFASVYAWN
361	RKRISNCVAD	YSVLYNSASF	STFKCYGVSP	TKLNDLCFTN	VYADSFVIRG	DEVQRQIAPGQ
421	TGKIADYNYK	LPDDFTGCVI	AWNSNNLDSK	VGGNYNYLYR	LFRKSNLKP	ERDISTEIYQ
481	AGSTPCNGVE	GFNCYFPLQS	YGFQPTNGVG	YQPYRVVVL	FELLHAPATV	CGPKKSTNLV
541	KNKCVNFNFN	GLTGTGVLTE	SNKKFLPFQ	FGRDIADTTD	AVRDPQTLEI	LDITPCSFQ
601	VSVITPGTNT	SNQVAVLYQD	VNCTEVPVAI	HADQLTPTWR	VYSTGSNVFQ	TRAGCLIGAE
661	HVNNSEYCDI	PIGAGICASY	QTQTNTPRRA	RSVASQSI	YTMSLGAENS	VAYSNNNSIAI
721	PTNFTISVTT	EILPVSMTKT	SVDCTMYICG	DSTECNLLL	QYGSFCTQLN	RALTGIAVEQ
781	DKNTQEVFAQ	VKQIYKTPPI	KDFGGFNFSQ	ILPDPSKPSK	RSFIEDLLFN	KVTLADAGFI
841	KQYGDCLGDI	AARDLICAQK	FNLGTVLPPL	LTDEMIAQYT	SALLAGTITS	GWTFGAGAA
901	QIPFAMQMAY	RFNGIGVTQN	VLYENQKLI	NQFNSAIGKI	QDSLSTASA	LGKLQDVVNQ
961	NAQALNTLVK	QLSSNFGAIS	SVLNDILSRL	DKVEAEVQID	RLITGRLQSL	QTYVTQQLIR

1021	A AEIRASANL	A AATKMSECVL	G QSKRVDFCG	K GYHLSMSPQ	S SAPHGVVFLH	V VTYVPAQEKN
1081	F FTAPAICHD	G GKAHFPREGV	F FVSNGTHWV	T TQRNFYEPQI	I ITDNTFVSG	N NCDVVIGIVN
1141	N NTVDPLQPE	L LDSFKEELDK	Y YFKNHTSPDV	D DLGDISGINA	S SVVNIQKEID	R RLNEVAKNLN
1201	E ESLIDLQELG	K KYEQYIKWPW	Y YIWLGFIAGL	I IAIVMVTIML	C CCMTSCCSCL	K KGCCSCGSCC
1261	K KFDEDDSEPV	L LKGVKLHYT				

Secuencia de inserción de ADN de pGX9501 (SEQ ID NO: 2) (secuencia líder de IgE subrayada):

```

1      ATGGATTGGA CTTGGATTCT CTTTCTCGTT GCTGCAGCCA CACGCGTTCA TAGCAGCCAG
61      TGTGTGAACC TGACCACCAG AACACAGCTG CCTCCTGCCT ACACCAACAG CTTACCAGAG
121     GGAGTCTACT ACCCAGACAA AGTCTTCAGA AGCTCTGTGC TGCACAGCAC CCAGGACCTG
181     TTCCTGCCTT TCTTCAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA TCCACGTGTC TGGCACCAAC
241     GGCACCAAGA GATTTGACAA CCCTGTTCTT CCTTTCAATG ATGGCGTGTA CTTTGCCAGC
301     ACAGAGAAGA GCAACATCAT CCGAGGCTGG ATCTTTGGCA CCACCTGGA CAGCAAAACC
361     CAGAGCCTGC TGATCGTGAA CAACGCCACC AACGTGGTCA TCAAGGTGTG TGAGTTCCAG
421     TTCTGCAATG ACCCTTTCTT GGGCGTGTAC TACCACAAGA ACAACAAGTC CTGGATGGAG
481     TCTGAGTTCA GAGTCTACAG CTCTGCCAAC AACTGCACAT TTGAATATGT GTCCCAGCCT
541     TTCCTGATGG ACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAACTTTAAGA ACCTGAGAGA ATTTGTGTTC
601     AAGAACATCG ATGGCTACTT CAAGATCTAC AGCAAGCACA CACCCATCAA CCTGGTGAGA
661     GACCTGCCTC AGGGCTTCTC TGCCCTGGAG CCTCTGGTGG ACCTGCCCCAT CGGCATCAAC
721     ATCACCAGAT TCCAGACCCT GCTGGCCCTG CACAGAAGCT ACCTGACCCC AGGAGACAGC
781     AGCAGCGGCT GGACAGCTGGAGCTGCTGCC TACTACGTGG GCTACCTGCA GCCCAGGACC
841     TTCCTGCTGA AGTACAACGA AAATGGCACC ATCACAGATG CTGTTGACTG TGCCCTGGAC
901     CCTCTTAGCG AGACCAAGTG CACCCTGAAG TCCTTCACAG TGGAGAAAGG CATCTACCAG
961     ACCAGCAACT TCCGAGTGCA GCCAACAGAG AGCATCGTGA GATTTCACAA CATCACCAAC
1021    CTGTGCCCTT TTGGAGAAGT CTTCAATGCC ACCAGATTTG CTTCTGTGTA CGCCTGGAAC
1081    AGAAAAAGAA TCAGCAACTG TGTGGCTGAC TACTCTGTGC TGTACAACTC TGCCTCCTC
1141    TGAACCTTCA AGTGCTATGG AGTCTCTCCA ACCAAGCTGA ATGACCTGTG CTTACCAAC
1201    GTGTATGCTG ACAGCTTTGT GATCAGAGGA GATGAAGTGC GGCAGATTGC TCCTGGCCAG
1261    ACAGGCAAGA TTGCTGACTA CAACTACAAG CTGCCTGATG ACTTCACAGG CTGTGTCATC
1321    GCCTGGAACA GCAACAACCT GGACAGCAAG GTGGGCGGCAACTACAATA CCTGTACAGA
1381    CTTTTACAGG AGAGCAACCT GAAGCCTTTT GAAAGAGACA TCTCCACAGA GATCTACCAG
1441    GCTGGCAGCA CACCCTGCAA TGGTGTGGAA GGCTTCAACT GCTACTTCCC TCTGCAGAGC
1501    TACGGCTTCC AGCCAACAAA TGGCGTGGGT TACCAGCCTT ACAGAGTGGT GGTGCTGTCC
1561    TTTGAGCTGC TGCACGCCCT TGCCACAGTG TGTGGCCCCA AGAAGAGCAC CAACCTGGTG
1621    AAGAACAAAT GTGTGAACTT CAATTTCAAT GGCCTGACAG GCACAGGAGT GCTGACAGAG
1681    AGCAACAAGA AGTTTCTTCC TTTCCAGCAG TTTGGAAGAG ACATTGCTGA CACCACAGAT
1741    GCTGTGAGAG ATCCTCAGAC CCTGGAGATC CTGGATATCA CACCCTGCTC CTTTGGAGGA
1801    GTTTCTGTCA TCACACCTGG CACCAATACC AGCAACCAAG TGGCTGTGCT GTACCAAGAT
1861    GTGAATTGCA CAGAAGTGCC TGTGGCCATC CACGCTGACC AGCTGACACC CACCTGGAGA
1921    GTGTACAGCA CAGGCAGCAA TGTTTTCCAG ACAAGAGCTG GCTGCCTGAT TGGAGCAGAG
1981    CACGTGAACA ACAGCTATGA ATGTAGATC CCTATTGGAG CTGGCATCTG TGCCAGCTAC
2041    CAGACCCAAA CCAACAGCCC AAGAAGAGCC AGATCTGTGG CCAGCCAGAG CATCATCGCC
2101    TACACCATGA GCCTGGGAGCTGAGAACTCT GTGGCCTACA GCAACAACAG CATCGCCATC
2161    CCCACCAACT TCACCATCTC TGTGACCACA GAGATCCTGC CTGTGTCCAT GACCAAGACA
2221    TCTGTGGACT GCACCATGTA CATCTGTGGA GACAGCACAG AATGCAGCAA CCTGCTGCTG
2281    CAGTACGGCT CTTTCTGCAC CCAGCTGAAC AGAGCCCTGA CAGGCATCGCTGTGGAGCAG
2341    GACAAGAACA CACAGGAAGT GTTTGCCCAG GTGAAGCAGA TCTACAAAAA ACCACCCATC
2401    AAGGACTTTG GAGGCTTCAA TTTCTCCCAA ATCCTGCCTG ACCCCAGCAA GCCTTCCAAG
2461    AGAAGCTTCA TTGAAGACCT GCTGTTCAAC AAAGTGACCC TGGCTGATGC TGGCTTCATC
2521    AAGCAGTATG GAGACTGCCT GGGAGACATT GCTGCCAGAG ACCTGATCTG TGCCGAGAAG
2581    TTTAATGGCC TGAATGTGCT GCCTCCTCTG CTGACAGATG AAATGATCGC CAGTACACA
2641    TCTGCCCTGC TGGCTGGCAC CATCACCAGT GGCTGGACAT TTGAGCTGG AGCTGCCCTG
2701    CAGATCCCTT TTGCCATGCA GATGGCCTAC AGATTTAATG GCATCGGCGT GACCCAGAAC
2761    GTGCTGTACG AGAACCAGAA GCTGATCGCC AACCAGTTCA ACTCTGCCAT CGGCAAGATC
2821    CAGGACAGCCTGAGCAGCAC AGCCTCTGCC CTGGGCAAGC TGCAGGATGT GGTGAACCAA
2881    AAGCCCCAGGCCCTGAACAC CCTGGTGAAG CAGCTGAGCA GCAACTTTGG AGCCATCTCC
2941    TCTGTGCTGA ATGACATCCT GAGCCGGCTGGACAAGGTGG AAGCAGAAGT GCAGATCGAC
3001    AGACTCATCA CAGGCCGCCT GCAGAGCCTG CAGACCTACG TGACCCAGCA GCTGATCAGA
3061    GCTGCTGAGA TCCGGGCCTC TGCCAACCTG GCTGCCACCA AGATGTCAGA ATGTGTGCTG

```

3121 GGCCAGAGCAAAAGAGTGGA CTTCTGTGGC AAAGGCTACC ACCTGATGTC CTTCCCTCAG
 3181 TCTGCTCCTC ACGGCGTGGT GTTCCTGCAC GTGACCTACG TGCCTGCCCA GGAGAAGAAC
 3241 TTCACCACAG CTCCTGCCAT CTGCCACGAT GGCAAGGCCCACTTCCCAAG AGAAGGTGTC
 3301 TTTGTGTCCA ATGGCACCCA CTGGTTCGTG ACCCAGAGAA ACTTCTACGA GCCTCAGATC
 3361 ATCACCACAG ACAACACATT TGTGTCTGGC AACTGTGATG TGGTCATCGG CATCGTGAAC
 3421 AACACAGTTT ATGACCCTCT GCAGCCTGAG CTGGACAGCT TCAAAGAAGA GCTGGACAAG
 3481 TACTTCAAGA ACCACACATC TCCAGATGTG GACCTGGGAGACATCTCTGG CATCAATGCC
 3541 TCTGTGGTGA ACATCCAGAA GGAAATTGAC AGGCTGAACG AAGTGGCCAA GAACCTGAAC
 3601 GAAAGCCTCA TCGACCTGCA GGAGCTGGGCAAGTACGAGC AGTACATCAA GTGGCCTTGG
 3661 TACATCTGGC TGGGCTTCAT CGCTGGCCTC ATCGCCATCG TGATGGTGAC CATCATGCTG
 3721 TGCTGCATGA CCAGCTGCTG CTCTTGCTG AAGGGCTGCT GCAGCTGTGGCAGCTGCTGC
 3781 AAGTTTGATG AAGATGACTC TGAGCCTGTG CTGAAGGGCGTGAAGCTGCA CTACACA

Secuencia de ADN monocatenario de pGX9501 (SEQ ID NO: 3):

1 gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatc gcgttgacat tgattattga ctagtatta
 61 atagtaatca attacggggg cattagtcca tagcccatat atggagtcc gcgttacata
 121 acttacggta aatggcccg cttgctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat
 181 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga
 241 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc
 301 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat tatgccagt acatgacctt
 361 atgggacttt cctactggc agtacatcta cgtattagtc atcgtatta ccatggtgat
 421 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggtt gactcacggg gattccaag
 481 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaatcaac gggacttcc
 541 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatggg ggtaggcgtg tacggtggga
 601 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga
 661 aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttgg
 721 accgagctcg gatccgccac catggattgg acttggattc tcttctcgt tgctgcagcc
 781 acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctcctgcc
 841 tacaccaaca gttcaccag aggagtctac taccagaca aagtcttcag aagctctgtg
 901 ctgcacagca cccaggacct gttcctgcct ttctcagca acgtgacctg gttccagcc
 961 atccacgtgt ctggcaccaa cggcaccaag agattgaca accctgttct tctttcaat
 1021 gatggcgtgt actttgccag cacagagaag agcaacatca tccgaggctg gatctttggc
 1081 accacctgg acagcaaac ccagagcctg ctgatctga acaacgccac caacgtggc
 1141 atcaaggtgt gtgagtcca gttctgcaat gaccttcc tggcggtgta ctaccacaag
 1201 aacaacaagt cctggatgga gtctgagtc agagtctaca gctctgcaa caactgcaca
 1261 ttgaatatg tgtccagcc ttctgatg gacctggagg gcaagcagg caacttaag
 1321 aacctgagag aattgtgtt caagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac
 1381 acacctatca acctggtgag agacctgcct cagggcttct ctgccctgga gcctctggtg
 1441 gacctgcca tcggcatcaa catcaccaga ttccagacc tgctggccct gcacagaagc
 1501 tacctgacct caggagacag cagcagcggc tggacagctg gagtgctgc ctactacgtg
 1561 ggctacctgc agcccaggac ctctctgctg aagtacaacg aaaatggcac catcacagat
 1621 gctgttgact gtgccctgga cctcttagc gagaccaagt gcacctgaa gtccttcaca
 1681 gtggagaaag gcatctacca gaccagcaac ttccgagtgc agccaacaga gagcatcgtg

1741 agatttccaa acatcaccaa cctgtgccct ttggagaag tcttcaatgc caccagattt
 1801 gcttctgtgt acgcctggaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgtg
 1861 ctgtacaact ctgcctcctt ctccaccttc aagtgtatg gagtctctcc aaccaagctg
 1921 aatgacctgt gcttcaccaa cgtgtatgct gacagctttg tgatcagagg agatgaagtg
 1981 cggcagattg ctcttgccca gacaggcaag attgtgact acaactacaa gctgcctgat
 2041 gacttcacag gctgtgtcat cgcttggaa agcaacaacc tggacagcaa ggtgggaggc
 2101 aactacaact acctgtacag acttttcagg aagagcaacc tgaagcctt tgaaagagac
 2161 atctccacag agatctacca ggctggcagc acacctgca atggtgtgga aggttcaac
 2221 tgctacttcc ctctgcagag ctacggcttc cagccaacaa atggcgtggg ctaccagcct
 2281 tacagagtgg tgggtgtgtc ctttgagctg ctgcacgccc ctgccacagt gtgtggcccc
 2341 aagaagagca ccaacctggt gaagaacaaa tgtgtgaact tcaattcaa tggcctgaca
 2401 ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagtttctc cttccagca gtttgaaga
 2461 gacattgtgt acaccacaga tgctgtgaga gatcctcaga ccttgagat cctggatatc
 2521 acacctgct ctttggagg agtttctgtc atcacacctg gcaccaatac cagcaaccaa
 2581 gtggctgtgc tgtaccaaga tgtgaattgc acagaagtgc ctgtggccat ccacgtgac
 2641 cagctgacac ccacctggag agtgtacagc acaggcagca atgtttcca gacaagagct
 2701 ggctgcctga ttggagcaga gcacgtgaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga
 2761 gctggcatct gtgccagcta ccagacccaa accaacagcc caagaagagc cagatctgtg
 2821 gccagccaga gcatcatcgc ctacaccatg agcctgggag ctgagaactc tgggcctac
 2881 agcaacaaca gcatgccat cccaccaac ttcaccatct ctgtgaccac agagatcctg
 2941 cctgtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgcaccatgt acatctgtgg agacagcaca
 3001 gaatgcagca acctgtgtct gcagtacggc tccttctgca ccagctgaa cagagccctg
 3061 acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag tgttgccca ggtgaagcag
 3121 atctacaaaa caccacccat caaggacttt ggaggcttca atttctcca aatcctgcct
 3181 gacccagca agccttcaa gagaagcttc attgaagacc tgctgttcaa caaagtgacc
 3241 ctggctgatg ctggcttcat caagcagtat ggagactgcc tgggagacat tgctgcaga
 3301 gacctgatct gtgccagaa gttaatggc ctgactgtgc tgcctcctct gctgacagat
 3361 gaaatgatcg ccagctacac atctgccctg ctggctggca ccatcaccag tggctggaca
 3421 ttggagctg gagctgccct gcagatccct ttgccatgc agatggccta cagatttaat
 3481 ggcacggcgc tgaccagaa cgtgtgttac gagaaccaga agctgatcgc caaccagttc
 3541 aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctgggcaag
 3601 ctgcaggatg tggtaacca aaacgcccag gccctgaaca cctgggtgaa gcagctgagc
 3661 agcaactttg gagcatctc ctctgtgtg aatgacatcc tgagccggct ggacaagggtg
 3721 gaagcagaag tgcagatcga cagactcatc acaggccgcc tgcagagcct gcagacctac
 3781 gtgaccagc agctgatcag agctgtgag atccgggcct ctgccaacct ggctgccacc
 3841 aagatgtcag aatgtgtgt gggccagagc aaaagagtgg acttctgtgg caaaggctac
 3901 cacctgatgt ctttccctca gtctgtcct cacggcgtgg ttttctgca cgtgacctac
 3961 gtgctgccc aggagaagaa cttaccaca gtcctgcca tctgccacga tggcaaggcc
 4021 cacttcccaa gagaagggtg ctttgttcc aatggcacc actggttcgt gaccagaga

4081 aacttctacg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttgtgtctgg caactgtgat
 4141 gtggatcatg gcatcgtgaa caacacagtt tatgaccctc tgcagcctga gctggacagc
 4201 ttcaaagaag agctggacaa gtacttcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggga
 4261 gacatctctg gcatcaatgc ctctgtgggtg aacatccaga aggaattga caggctgaac
 4321 gaagtggcca agaacctgaa cgaaagcctc atcgacctgc aggagctggg caagtacgag
 4381 cagtacatca agtggccttg gtacatctgg ctgggcttca tcgctggcct catgccatc
 4441 gtgatgggta ccatcatgct gtgctgcatg accagctgct gctcttgct gaagggtgc
 4501 tgcagctgtg gcagctgtg caagttgat gaagatgact ctgagcctgt gctgaagggc
 4561 gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca
 4621 gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc cgtgccttc
 4681 ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttctaataaaaatgagga aattgcatc
 4741 cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg
 4801 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttact
 4861 gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggaagg
 4921 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctgcc gccaggatc tgatggcgca
 4981 ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg
 5041 gattgcacgc aggttctccg gccgctggg tggagaggct attcggctat gactgggcac
 5101 aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgag gggcgccgg
 5161 ttcttttgt caagaccgac ctgtccgggt cctgaatga actgcaagac gaggcagcgc
 5221 ggctatctg gctggccacg acgggcttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtactg
 5281 aagcgggaag ggactggctg ctattgggctg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc
 5341 acctgtctc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg gctgcatacgc
 5401 ttgatccgc tacctgcca ttgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta
 5461 ctggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
 5521 cgccagccga actgttgcg aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtg
 5581 tgacctatg cgtgcctgc ttgccgaata tcatgggtga aaatggccgc ttttctggat
 5641 tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagc ttggctacc
 5701 gtgatattg tgaagagctt ggccggaat gggctgaccg cttcctcgtg cttacggta
 5761 tcgccgtcc cgattcgag cgcacgcct tctatgcct tctgacgag ttctctgaa
 5821 ttattaacgc ttacaatttc ctgatcggt attttctct tacgcatctg tgcggtatt
 5881 cacaccgat caggtggcac tttcgggga aatgtgcgc gaaccctat ttgttatt
 5941 ttctaaatac attcaaata gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgctcaa
 6001 taatagcac tgctaaaact tcattttaa ttaaaagga ttaggtgaa gatcctttt
 6061 gataatcica tgacaaaat ccctaacgt gagtttctg tccactgagc gtcagacccc
 6121 gtagaaaaga tcaaaggatc ttctgagat cttttttc tgcgcgtaat ctgctgctg
 6181 caaacaaaaa aaccaccgt accagcgggt gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact
 6241 cttttccga aggttaactg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tctctagt
 6301 tagccgtagt taggccacca ctcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg
 6361 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac

6421 tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca
 6481 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
 6541 gaaagcgcca cgctcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag cggcaggggc
 6601 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct
 6661 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc agggggggcg
 6721 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacgggt tcctggcctt ttgctggcct
 6781 ttgctcaca tgttctt

Secuencia de inserción de aminoácidos de antígeno espicular atípico de SARS-CoV-2 de pGX9503 (SEQ ID NO: 4) (secuencia líder de IgE subrayada):

1	<u>MDWTWILFLV</u>	<u>AAATRVHSSQ</u>	CVNLTTRTQL	PPAYTNSFTR	GVYYDPDKVFRSSVLHSTQDL
61	FLPFFSNVTW	FHAIHVSGTN	GTRKFDNPVL	PFNDGVYFAS	TEKSNIIRGW IFGTTLDSKT
121	QSLIVNNAT	NVVIKVCEFQ	FCNDPFLGVY	YHKNNKSWME	SEFRVYSSAN NCTFEYVSQP
181	FLMDLEGKQGNFKNLREFVF	KNIDGYFKIY	SKHTPINLVR	DLPQGFSALE	PLVDLPIGIN
241	ITRFQTLLAL	HRSYLTGDS	SSGWTAGAAA	YYVGYLQPR	FLLKYNGT ITVAVACALD
301	PLSETKCTLK	SFTVEKGIYQ	TSNFRVQPT	SIVRFPNITN	LCPFGEVFNA TRFASVYAWN
361	RKRISNCVAD	YSVLYNSASF	STFKCYGVSP	TKLNDLCFTN	VYADSFVIRG DEVRQIAPGQ
421	TGKIADYNYK	LPDDFTGCVI	AWNSNNLDSK	VGGNYNYLYR	LFRKSNLKPF ERDISTEIQ
481	AGSTPCNGVEGFNCYFPLQS	YGFQPTNGVG	YQPYRVVLS	FELLHAPATV	CGPKKSTNLV
541	KNKCVNFNFNGLTGTGVLTE	SNKKFLPFQQ	FGRDIADTTD	AVRDPQTLEI	LDITPCSF
601	VSVITPGANT	SNQVTVLYQD	VNCTEVPVAI	HADQLTPTWR	VYSTGSNVFK TRAGCLIGAE
661	HVNNSYECDI	PIGAGICASY	QTQTNPRRA	RSTASQSI	YTMSLGAENSVAYSNN
721	PTNFTISVTT	EILPVSMTKT	SVDCTMYICS	DSTECSNPLL	QYGSFCTQLNRALTGIAVEQ
781	DKNTQEVFAQVKQIYKTPPI	KDFGGFNFSQ	ILPDPSKPSK	RSFIEDLLFN	KVTLADAGFI
841	KQYGDCLGDI	AARDLICAQK	FNGLTVLPPL	LTDEMIAQYT	SALLAGTITS GWTFGAGAAL
901	QIPFAMQMAY	RFNGIRVTQN	VLLENQKLI	NQFNSAIGKI	QDSLSTASA LGKLQDVVNQ
961	NAQALNTLVK	QLSSTFSTIS	SVLNDILSRL	DKVEAEVQID	RLITGRLQSL QTYVTQQLIR
1021	AAEIRASANL	KATKMSECVL	GQSKRVDFCG	KGYHLSFPQ	SAPHGVVFLH VTYVPAQEK
1081	FTTAPATCHD	GKAHFPREGV	FVSNGTHWV	TQRNFDEPQI	ITDNTFVSG NCDVVIGIVN
1141	NTVYDPLQPE	LDSFKEELDK	YFKNHTSPDV	DLGDISGINA	SVVNIQKEID RLNEVAKNLN
1201	ESLIDLQELG	KYEYIKWPW	YIWLGFIAGL	IAIVMTIML	CCMTSCCCLKGCCSCGSCC
1261	KFDEDDSEPV	LKGVKLHYT			

Secuencia de inserción de ADN de pGX9503 (SEQ ID NO: 5) (secuencia líder de IgE subrayada):

1 ATGGATTGGA CCTGGATTCT TTTTCTCGTT GCAGCTGCTA CACGCGTTCA TAGCAGCCAG
 61 TGTGTGAACC TGACCACCAG AACACAGCTG CCTCCTGCCT ACACCAACAG CTTACCAGA
 121 GGAGTCTACT ACCCAGACAA GGTGTTTCTGAGTCTGTGC TGCACAGCAC CCAGGACCTC
 181 TTCCTGCCTT TCTTACAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA TCCACGTGTC TGGCACCAAC
 241 GGCACCAAGAGATTTGACAA CCCTGTGCTG CCTTTCAATG ATGGTGTGTA CTTTGCCAGC
 301 ACAGAGAAGA GCAACATCAT CCGAGGCTGGATCTTTGGCA CCACCCTGGACAGCAAAACA

361 CAGAGCCTGCTGATCGTGAA TAATGCCACC AACGTGGTCA TCAAGGTGTG TGAGTTCCAG
421 TTCTGCAATG ACCCTTTCCT GGGCGTGAC TACCACAAGA ACAACAAGTC CTGGATGGAG
481 TCTGAGTTCC GAGTGTACAG CTCTGCCAAC AACTGCACAT TTGAATATGT GTCCCAGCCT
541 TTCCTGATGG ACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAATTTCAAGA ACCTGAGAGAATTTGTGTTT
601 AAGAACATCG ATGGCTACTT CAAGATCTAC AGCAAGCACA CACCCATCAA CCTGGTGAGA
661 GATCTTCCTC AGGGCTTCTC TGCCCTGGAG CCTCTGGTGG ACCTGCCCCAT CGGCATCAAC
721 ATCACCCGCT TTCAGACCCT GCTGGCCCTG CACAGAAGCT ACCTGACCCC AGGAGACAGC
781 AGCAGCGGCTGGACAGCTGGAGCTGCTGCC TACTACGTGG GCTACCTGCA GCCAAGAACC
841 TTCCTGCTGA AGTACAACGA AAATGGCACC ATCACTGTGG CTGTGGCCTG TGCCCTGGAC
901 CCTCTTTCTG AGACCAAGTG CACCCTGAAG TCCTTCACAG TGGAGAAAGGCATCTACCAG
961 ACCAGCAACT TCAGAGTTCA GCCAACAGAG AGCATCGTGA GATTTCCAAA CATCACCAAC
1021CTGTGTCCTT TTGGAGAAGT CTTCAATGCC ACCAGATTG CTTCTGTGTA CGCCTGGAAC
1081AGAAAAAGAA TCAGCAACTG TGTGGCTGAC TACTCTGTGC TGTACAACCTC TGCCTCCTTC
1141TCCACCTTCA AGTGCTACGG TGTGTCTCCT ACCAAGCTGA ATGACCTGTG CTTACCAAC
1201GTGTATGCTG ACAGCTTTGT CATCAGAGGA GATGAAGTGC GGCAGATCGCCCCTGGCCAG
1261ACAGGCAAGA TTGCTGACTA CAACTACAAG CTGCCTGATG ACTTCACAGG CTGTGTCATC
1321GCCTGGAACA GCAACAACCT GGACAGCAAG GTGGGCGGCAACTACAATA CCTGTACAGA
1381CTTTTCAGGA AGAGCAACCT GAAGCCTTTT GAAAGAGACA TCTCCACAGA GATCTACCAG
1441GCTGGCAGCACACCCTGCAA TGGAGTGGA GGCTTCACT GCTACTTCCC TCTGCAGAGC
1501TACGGCTTCC AGCCCACCAA TGGCGTGGGCTACCAGCCTT ACAGAGTGGT GGTGCTGTCC
1561TTTGAGCTGC TGCACGCCCC TGCCACAGTG TGTGGCCCCA AGAAGAGCAC CAACCTGGTG
1621AAGAACAAAT GTGTGAACTT CAATTTCAAT GGCCTGACAG GCACAGGAGTGCTGACAGAG
1681AGCAACAAGA AGTTCCTGCC TTTCCAGCAG TTTGGAAGAG ACATTGCTGA CACCACAGAT
1741GCTGTGAGAGATCCTCAGAC CCTGGAGATC CTGGACATCA CACCCTGCTC CTTTGGAGGA
1801GTTTCTGTCA TCACACCTGG AGCCAACACC AGCAACCAAG TGACAGTGCT GTACCAAGAT
1861GTGAACTGCA CAGAAGTTCC TGTGGCCATC CACGCTGACC AGCTGACCCCC AACCTGGAGA
1921GTCTACAGCA CAGGCAGCAA CGTGTTTAAA ACAAGAGCTG GCTGCCTGAT TGGAGCAGAG
1981CACGTGAACA ACAGCTATGA ATGTGACATC CCTATTGGAG CTGGCATCTG TGCCAGCTAC
2041CAGACCCAAA CCAACAGCCC AAGAAGAGCC AGGAGCACAG CCAGCCAGAGCATCATCGCC
2101TACACCATGA GCCTGGGAGCAGAGAATCT GTGGCCTACA GCAACAACAG CATCGTCATC
2161CCCACCAACT TCACCATCTC TGTGACCACA GAGATCCTGC CTGTGTCCAT GACCAAGACA
2221TCTGTGGACT GCACCATGTA CATCTGCAGT GACAGCACAG AATGCAGCAA CCCTCTGCTG
2281CAGTACGGCT CCTTCTGCAC CCAGCTGAAC AGAGCCCTGA CAGGCATCGCTGTGGAGCAG
2341GACAAGAACA CACAGGAAGT GTTTGCCAG GTGAAGCAGA TCTACAAAAC ACCACCCATC
2401AAGGACTTTG GAGGCTTCAA CTCTCCAG ATCCTGCCTG ACCCCAGCAA GCCCAGCAAG
2461AGAAGCTTCA TTGAAGACCT GCTGTTCAAC AAAGTGACCC TGGCTGATGC TGGCTTCATC
2521AAACAATATG GAGACTGCCT GGGAGACATT GCTGCCAGAG ACCTGATCTG TGCCAGAAG
2581TTTAATGGCC TGAAGTGCT GCCTCCTCTG CTGACAGATG AAATGATCGC CCAGTACACA
2641TCTGCCCTGC TGGCTGGCAC CATCACATCT GGCTGGACAT TTGGAGCTGG AGCTGCCCTG
2701CAGATCCCTT TTGCCATGCA GATGGCCTAC AGATTTAATG GCATCAGAGT GACCCAGAAC
2761GTGCTGTATG AAAACCAGAA GCTGATCGCC AACCAGTTCA ACTCTGCCAT CGGCAAGATC
2821CAGGACAGCCTGAGCAGCAC AGCCTCTGCC CTGGGCAAGC TGCAGGATGT GGTGAACCAA
2881AATGCCCAGG CCCTGAACAC CCTGGTGAAG CAGCTGAGCA GCACCTTCTC CACCATCTCC

2941AGCGTGCTGAATGACATCCT GAGCCGGCTGGACAAGGTGG AAGCTGAGGT GCAGATCGAC
 3001AGACTCATCA CAGGCCGGCTGCAGAGCCTG CAGACCTACG TGACCCAGCA GCTGATCAGA
 3061GCTGCTGAGA TCAGAGCTTC TGCCAACCTG AAGGCCACCA AGATGTCAGA ATGTGTGCTG
 3121GGCCAGAGCAAGAGAGTGGA CTTCTGTGGC AAAGGCTACC ACCTGATGTC CTTCCCTCAG
 3181TCTGCTCCTC ACGGCGTGGT GTTCCTGCAC GTGACCTACG TGCCTGCCCCA GGAGAAGAAC
 3241TTCACCACAG CTCCTGCCAC CTGCCACGAT GGCAAAGCCC ACTTCCCAAG AGAAGGCGTC
 3301TTTGTGTCCA ATGGCACCCA CTGGTTCGTG ACCCAGAGAA ACTTTGATGA GCCTCAGATC
 3361ATCACCACAG ACAACACATT TGTTTCTGGC AACTGTGATG TGGTCATCGG CATCGTGAAC
 3421AACACAGTTT ATGACCCTCT GCAGCCTGAG CTGGACAGCT TCAAAGAAGA GCTGGACAAG
 3481TACTTCAAGA ACCACACATC TCCAGATGTG GACCTGGGAGACATCTCTGG CATCAATGCC
 3541TCTGTGGTGA ACATCCAGAA GGAAATTGAC AGGCTGAACG AAGTGGCCAA GAACCTGAAC
 3601GAAAGCCTCA TCGACCTGCA GGAGCTGGGCAAGTACGAGC AGTACATCA GTGGCCTTGG
 3661TACATCTGGC TGGGCTTCAT TGCTGGCCTC ATCGCCATCG TGATGGTGAC CATCATGCTG
 3721TGCTGCATGA CCAGCTGCTG CTCTTGCCTG AAGGGCTGCT GCAGCTGTGGCAGCTGCTGC
 3781AAGTTTGATG AAGATGACTC TGAGCCTGTG CTGAAGGGCG TGAAGCTGCA CTACACA

Secuencia de ADN monocatenario de pGX9503 (SEQ ID NO: 6):

1 gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta
 61 atagtaatca attacggggg cattagtta tagcccatat atggagtcc gcgttacata
 121 acttacggta aatggccgc ctggctgacc gccaacgac cccgcccatt tgacgtcaat
 181 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttc cattgacgtc aatgggtgga
 241 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
 301 ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgccagc acatgacctt
 361 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat
 421 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcgttt gactcacggg gattccaag
 481 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaatcaac gggactttcc
 541 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatggg ggtaggcgtg tacggtggga
 601 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatgca
 661 aattaatagc actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggt
 721 accgagctcg gatccggcac catggattgg acctggattc ttttctcgt tgcagctgct
 781 acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctcctgcc
 841 tacaccaaca gttcaccag aggagtctac taccagaca aggtgttcag aagctctgtg
 901 ctgcacagca cccaggacct ctctctgcct ttctcagca acgtgacctg gttccacgcc
 961 atccacgtgt ctggcaccaa cggcaccaag agatttgaca accctgtgct gcctttcaat
 1021 gatggtgtgt actttgccag cacagagaag agcaaatca tccgaggctg gatctttggc
 1081 accaccctgg acagcaaac acagagcctg ctgatcgtga ataatccac caacgtggtc
 1141 atcaaggtgt gtgagtcca gtctgcaat gacccttcc tgggcgtgta ctaccacaag
 1201 aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc cgagtgtaca gctctgcaa caactgcaca
 1261 ttgaatatg tgtccagcc ttctctgatg gacctggagg gcaagcaggg caatttcaag
 1321 aacctgagag aatttgtgt caagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac

1381 acacccatca acctggtgag agatcttct cagggcttct ctgccctgga gcctctggtg
 1441 gacctgccca tcggcatcaa catcacccgc tttagaccc tgctggccct gcacagaagc
 1501 tacctgaccc caggagacag cagcagcggc tggacagctg gagctgctgc ctactacgtg
 1561 ggctacctgc agccaagaac ctctctgctg aagtacaacg aaaatggcac catcactgtg
 1621 gctgtggcct gtgccctgga ccctcttct gagaccaagt gcaccctgaa gtccttcaca
 1681 gtggagaaag gcatctacca gaccagcaac tttagagttc agccaacaga gagcatcgtg
 1741 agatttccaa acatcaccaa cctgtgtctt ttggagaag tcttaatgc caccagattt
 1801 gcttctgtgt acgcttgaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgtg
 1861 ctgtacaact ctgctcctt ctccacctc aagtgtctg gtgtgtctc taccaagctg
 1921 aatgacctgt gcttcacaa cgtgtatgt gacagcttg tcatcagagg agatgaagtg
 1981 cggcagatcg cccctggcca gacaggcaag attgtgact acaactacaa gctgctgat
 2041 gacttcacag gctgtgtcat cgcttgaac agcaacaacc tggacagcaa ggtggcgccg
 2101 aactacaact acctgtacag actttcagg aagagcaacc tgaagcctt tgaagagac
 2161 atctccacag agatctacca ggctggcagc acaccctgca atggagtga aggttcaac
 2221 tgctactcc ctctgcagag ctacggctc cagccacca atggcgtggg ctaccagct
 2281 tacagagtgg tgggtctgtc ctttgagctg ctgcacgcc ctgccacagt gtgtggccc
 2341 aagaagagca ccaacctgtt gaagaacaaa tgtgtgaact tcaattcaa tggcctgaca
 2401 ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagttcctgc cttccagca gtttgaaga
 2461 gacattgtg acaccacaga tgctgtgaga gatcctcaga ccctggagat cctggacatc
 2521 acaccctgct ctttggagg agtttctgtc atcacacctg gagccaacac cagcaaccaa
 2581 gtgacagtgc tgtaccaaga tgtgaactgc acagaagttc ctgtggccat ccacgctgac
 2641 cagctgaccc caacctggag agtctacagc acaggcagca acgtgttaa aacaagagct
 2701 ggctgcctga ttggagcaga gcacgtgaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga
 2761 gctggcatct gtgccagcta ccagaccaa accaacagcc caagaagagc caggagcaca
 2821 gccagccaga gcatcatcgc ctacaccatg agcctgggag cagagaactc tgtggcctac
 2881 agcaacaaca gcatcgtcat cccaccaac ttaccatct ctgtgaccac agagatcctg
 2941 cctgtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgcacatgt acatctgcag tgacagcaca
 3001 gaatgcagca accctctgct gcagtacggc tccttctgca ccagctgaa cagagccctg
 3061 acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag tgttgccca ggtgaagcag
 3121 atctacaaaa caccacccat caaggacttt ggaggcttca acttctcca gatcctgcct
 3181 gacccagca agccagcaa gagaagctc attgaagacc tgctgttaa caaagtgacc
 3241 ctggctgatg ctggcttcat caaacaatat ggagactgcc tgggagacat tgctgccaga
 3301 gacctgatct gtgccagaa gtttaatggc ctgactgtgc tgctctctt gctgacagat
 3361 gaaatgatcg cccagtacac atctgccctg ctggctggca ccatcacatc tggctggaca
 3421 ttggagctg gagctgcctt gcagatccct ttgccatgc agatggccta cagatttaat
 3481 ggcacagag tgaccagaa cgtgtgtat gaaaaccaga agctgatcgc caaccagttc
 3541 aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctgggcaag
 3601 ctgcaggatg tggtaacca aaatgccag gccctgaaca ccctggtgaa gcagctgagc
 3661 agcaccttct ccacatctc cagcgtgctg aatgacatcc tgagccggct ggacaagggtg

3721 gaagctgagg tgcagatcga cagactcatc acaggccggc tgcagagcct gcagacctac
 3781 gtgaccagc agctgatcag agctgtgag atcagagctt ctgccaacct gaaggccacc
 3841 aagatgtcag aatgtgtgct gggccagagc aagagagtgg acttctgtgg caaaggctac
 3901 cacctgatgt ccttcctca gctgctcct cacggcgtgg tgtcctgca cgtgacctac
 3961 gtgcctgccc aggagaagaa cttcaccaca gtcctgcca cctgccacga tggcaaagcc
 4021 cacttccaa gagaaggcgt ctttgttcc aatggcacc actggttctg gaccagaga
 4081 aactttgatg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttgttctgg caactgtgat
 4141 gtggtcatcg gcatcgtgaa caacacagtt tatgaccctc tgcagcctga gctggacagc
 4201 ttcaaagaag agctggacaa gtactcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggga
 4261 gacatctctg gcatcaatgc ctctgtggtg aacatccaga aggaaattga caggctgaac
 4321 gaagtggcca agaacctgaa cgaaagcctc atcgacctgc aggagctggg caagtacgag
 4381 cagtacatca agtggccttg gtacatctgg ctgggcttca ttgctggcct catcgccatc
 4441 gtgatggta ccatcatgct gtgctgcatg accagctgct gctctgcct gaagggtgc
 4501 tgcagctgtg gcagctgctg caagttgat gaagatgact ctgagcctgt gctgaagggc
 4561 gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca
 4621 gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc cgtgccttc
 4681 ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc cttcctaataaaaatgagga aattgcatcg
 4741 cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg
 4801 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggtctat ggcttctact
 4861 gggcggttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggaagg
 4921 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctgcc gccaaggatc tgatggcgca
 4981 ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg
 5041 gattgcacgc aggttctccg gccgctggg tggagaggct attcggctat gactgggcac
 5101 aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgtccggct gtcagcgag gggcgcccgg
 5161 ttcttttgt caagaccgac ctgtccgggt cctgaatga actgcaagac gaggcagcgc
 5221 ggctatctg gctggccacg acgggcgtt cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg
 5281 aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgcatctc
 5341 acctgtctc tgcagagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg ctgcatacgc
 5401 ttgatccggc tacctgcca ttgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta
 5461 ctggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
 5521 cgccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgctg
 5581 tgacctatg cgatgcctgc ttgccgaata tcattggtgga aaatggccgc tttctggat
 5641 tcactgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg ttggctacc
 5701 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg ctctctctg ctttacggta
 5761 tcgccgctcc cgattcgag cgcatcgct tctatgcct tctgacgag ttcttctgaa
 5821 ttattaacgc ttacaattc ctgatcggt atttctct tacgcatctg tgcggtatt
 5881 cacaccgat cagggtggc tttcgggga aatgtgcgc gaaccctat ttgtttatt
 5941 ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgctcaa
 6001 taatagcacg tgctaaaact tcattttaa tttaaagga ttaggtgaa gatcctttt

6061 gataatctca tgacaaaat ccctaacgt gagtttctg tccactgagc gtcagacccc
 6121 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg
 6181 caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact
 6241 cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgagatac caaatactgt tcttctagt
 6301 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg
 6361 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac
 6421 tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca
 6481 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
 6541 gaaagcgcca cgctcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcaggggc
 6601 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttagtctct
 6661 gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc agggggggcg
 6721 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt tcctggcctt ttgctggcct
 6781 tttgctcaca tgttctt

SEQ ID NO: 7 Cebador directo de pGX9501 CAGGACAAGAACACACAGGAA

SEQ ID NO: 8 Cebador inverso de pGX9501 CAGGCAGGATTTGGGAGAAA

SEQ ID NO: 9 Sonda de pGX9501 ACCCATCAAGGACTTTGGAGG

SEQ ID NO: 10 Cebador directo de pGX9503 AGGACAAGAACACACAGGAAG;

SEQ ID NO: 11 Cebador inverso de pGX9503 CAGGATCTGGGAGAAGTTGAAG

SEQ ID NO: 12 Sonda de pGX9503 ACACCACCCATCAAGGACTTTGGA

SEQ ID NO: 13 Cebador directo de β -actina GTGACGTGGACATCCGTAA

SEQ ID NO: 14 Cebador inverso de β -actina CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG

SEQ ID NO: 15 Sonda de β -actina TACCCTGGCATTGCTGACAGGATG

SEQ ID NO: 16 PHGVVFLHV

SEQ ID NO: 17 VVFLHVTYV

SEQ ID NO: 18: 2019-nCoV_N1-F 5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3'

SEQ ID NO: 19: 2019-nCoV_N1-R 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3'

SEQ ID NO: 20: 2019-nCoV_N1-P

5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3'

SEQ ID NO: 21: 2019-nCoV_sgE-directo 5' CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC 3'
GTAAGCGGCTCCTCCGCAUU

SEQ ID NO: 22: 2019-nCoV_sgE-inverso 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3'

SEQ ID NO: 23: 2019-nCoV_sgE-sonda

5' FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3'