

## **VACUNA CONTRA EL CORONAVIRUS QUE COMPRENDE UNA PROTEINA MOSAICO**

### **REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

**[1]** La presente solicitud incorpora a modo de referencia en su totalidad la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 63/172.495, presentada el 8 de abril de 2021; la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 63/263.131, presentada el 27 de octubre de 2021; y la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 63/301.417, presentada el 20 de enero de 2022.

### **REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO EN FORMA ELECTRÓNICA**

**[2]** El contenido del listado de secuencias enviado en forma electrónica en archivo de texto ASCII (Nombre 4997\_002PC03\_Seqlisting\_ST25.txt; Tamaño: 148.967 bytes; y Fecha de Creación: 4 de abril de 2022) presentado con la solicitud se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

### **1. CAMPO**

**[3]** La presente divulgación provee composiciones para vacunas y métodos para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus y/o para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto.

### **2. ANTECEDENTES DE ALA DIVULGACIÓN**

**[4]** Los coronavirus (CoV) tienen una distribución mundial y en su mayoría infectan a los animales, incluyendo aves y mamíferos. En los humanos, en general causan infecciones respiratorias leves, tales como las que se observan en los casos de resfrío común. Yu, P., y col., *Infect Genet Evol.* 69:224-229 (2019). Sin embargo, algunas infecciones recientes por coronavirus de humanos

(HCoV) han resultado en epidemias letales, las cuales incluyen SARS, MERS, y ahora la pandemia por COVID-19. Wu, F., y col., *Nature* 579(7798):265-269 (2020). El SARS-CoV-2 es un virus de aparición reciente de ARN de cadena simple de sentido positivo, responsable de la actual neumonía pandémica que comenzó a inicios de noviembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, Provincia de Hubei, China.

**[5]** La infección por los HCoV resulta en fuertes respuestas de células B y T. La evidencia actual indica fuertemente que las respuestas de tipo Th1 tienen un rol significativo para controlar las infecciones por HCoV mediante la inducción de respuestas neutralizantes de IgG específicas de larga duración que pueden permanecer por años. Como en el caso de otras infecciones virales similares, las respuestas de células T pueden tener un rol en la inducción de una amplia respuesta inmunológica protectora cruzada. Liu, W.J., y col., *J Immunol.* 198(2):873-882 (2017). Por lo tanto, la información sobre los epitopes para las células T es importante en el diseño de una vacuna de reacción cruzada que proteja contra todos los coronavirus de humano.

**[6]** En la actualidad, existen varias vacunas comercialmente disponibles contra el COVID-19. Existen muchas compañías biofarmacéuticas o sectores académicos comprometidos en el desarrollo de una vacuna profiláctica mediante el uso de varias plataformas, incluyendo ARNm, ADN, vectores adenovirales y proteínas recombinantes. Callaway, E., *Nature* 581(7809):363-364 (2020); Callaway, E., *Nature*, doi: 10.1038/d41586-020-01247-2 (2020); Callaway, E., *Nature* 580(7805):576-577 (2020); Callaway, E., *Nature* 579(7800):481 (2020). A medida que la pandemia de COVID-19 se extiende alrededor del mundo, el SARS-CoV-2 muta rápidamente. Este hecho puede impactar de forma

significativa en la eficacia de cualquier candidato de vacuna actualmente en desarrollo debido a que los mismos se diseñaron en base a secuencias obtenidas de virus aislados tempranamente en la pandemia. Además, incluso si la pandemia actual logra ser controlada, se cree firmemente que el SARS-CoV-2 eventualmente volverá a surgir, produciendo olas epidémicas periódicas.

[7] Por lo tanto, existe una necesidad de estrategias preventivas a largo plazo para los HCoV y de vacunas de protección amplia que funcionen no solo contra las cepas actualmente circulantes de SARS-CoV-2 sino también contra nuevos virus que vayan a surgir a partir de la actual pandemia.

### **3. BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION**

[8] Se genera una secuencia de la proteína de la espícula (S) mosaico de coronavirus (MoCoV) *in silico* a partir de las secuencias naturales de diversas cepas de coronavirus (por ejemplo, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, MERS-CoV, Beta-coronavirus de murciélago, SARS, y SARS-CoV-2) y se optimiza para una cobertura máxima de epitopes para células T (por ejemplo, manteniendo las secuencias de epítopo en forma contigua) en lugar de mediante residuos consenso. Una secuencia mosaico con una cadena lineal de epitopes para células T de proteínas S de CoV de origen principalmente natural, opcionalmente incluyendo epitopes para células B y/o epitopes para linfocitos T citotóxicos (TCL), probablemente proveería una protección amplia y robusta en el enfrentamiento con el virus. Esto es debido a que se emplea un mecanismo de puntuación de objetivos que optimiza la cobertura máxima de epitopes para células T de una diversidad de cepas de coronavirus. Como consecuencia, la proteína sintética que se genera es menos propensa a los sesgos inherentes

dentro del cuerpo de datos públicamente disponibles. Más aún, es muy probable que la secuencia mosaico sea funcional y que esté plegada en forma apropiada.

**[9]** Como se describe más adelante, uno de los ejemplos de los autores usa vectores basados en virus vacuna Ankara (MVA) modificados, los cuales se usaron para expresar múltiples proteínas S mosaico de coronavirus. El vector MVA ofrece varias ventajas tales como 1) seguridad, 2) estabilidad, 3) rápida inducción de respuestas humores y celulares, y 4) múltiples rutas de inoculación.

**[10]** Un segundo ejemplo incluye el uso de un sistema de expresión en *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), el cual se usó para expresar el dominio de unión a receptor (RBD) de la proteína S mosaico de coronavirus. El sistema de expresión en *P. pastoris* ofrece varias ventajas, incluyendo el plegamiento apropiado en el retículo endoplásmico y la secreción de las proteínas recombinantes al ambiente externo de la célula. Además, debido a la producción limitada de proteínas secretorias endógenas, la purificación de las proteínas recombinantes es algo más fácil en el sistema de *P. pastoris* que en el sistema de MVA.

**[11]** La estrategia de vacuna mosaico minimiza las diferencias genéticas entre las secuencias antigénicas seleccionadas para la vacuna y las cepas de coronavirus, a la vez que maximiza la amplitud general de las respuestas inmunológicas de protección cruzada. Por lo tanto, la estrategia de vacuna mosaico tiene un gran potencial para ampliar la eficacia de las vacunas contra los coronavirus humanos, incluyendo la protección contra nuevos coronavirus tales como los que surgirán a partir de la pandemia actual. También es importante la capacidad de proveer una protección amplia contra múltiples cepas y variantes de coronavirus (por ejemplo, las variantes del SARS-CoV-2) con una

vacuna mosaico individual debido a que la aceptación social de una vacuna única probablemente sería mayor que para las vacunas múltiples, especialmente durante una pandemia, tal como la actual pandemia por COVID-19. Por lo tanto, la divulgación provee una vacuna contra los coronavirus humanos ampliamente protectora o universal basada en una o más proteínas S mosaico (sintéticas) de coronavirus (MoCoV) o fragmentos antigénicos de las mismas.

**[12]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido aislado o una molécula de ácido nucleico recombinante) que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas descritas o ejemplificadas en la presente, que son inmunogénicas para los antígenos derivados de dos o más cepas distintas de coronavirus (por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más cepas distintas de coronavirus).

**[13]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína de la espícula (S) mosaico de coronavirus (MoCoV) o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de humano. En algunos aspectos, los coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63

y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los coronavirus de murciélago se seleccionan del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[14]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende uno o más promotores. En algunos aspectos, el promotor es un promotor inducible. En algunos aspectos, el promotor es un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el uno o más promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor con capacidad para controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma. En algunos aspectos, el primer promotor está conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la

construcción de ácido nucleico comprende un primer promotor conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico y una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico.

**[15]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de M1), SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de M2), SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de M3), SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de M4), SEQ ID NO: 11 (secuencia de aminoácidos de MB), o SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos de M5).

**[16]** En algunos aspectos, la M5 comprende la sustitución de aminoácidos D510G (M5 + D510G; SEQ ID NO: 15), en donde la posición de la sustitución de aminoácidos es en relación a la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la M5 comprende la sustitución de aminoácidos I529T (M5 + I529T; SEQ ID NO: 16), en donde la sustitución de aminoácidos es en relación a la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, M5 comprende las sustituciones de aminoácido D510G y I529T (M5 + D510G + I529T; SEQ ID NO: 17), en donde las sustituciones de aminoácido son en relación con la SEQ ID NO: 13. Se sabe que las sustituciones de aminoácido D510G y I529T incrementan la resistencia de la entrada dirigida por la proteína S a la neutralización por los anticuerpos monoclonales y el suero de los pacientes de MERS. Véase Klein-Weber, H. y col., *Journal of Virology*, 93(2): e01381-18 (2019). En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos

que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[17]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 (secuencia de ácido nucleico de M1), SEQ ID NO: 4 (secuencia de ácido nucleico de M2), SEQ ID NO: 6 (secuencia de ácido nucleico de M3), SEQ ID NO: 10 (secuencia de ácido nucleico de M4), SEQ ID NO: 12 (secuencia de ácido nucleico de MB), SEQ ID NO: 14 (secuencia de ácido nucleico de M5), o un

complemento de las mismas. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o un complemento de las mismas.

**[18]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de humano. En algunos aspectos, los coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de murciélago. En

algunos aspectos, los coronavirus de murciélago se seleccionan del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[19]** En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor con capacidad para controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y un segundo promotor con capacidad para controlar la expresión de la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma. En algunos aspectos, el primer promotor está conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, y el segundo promotor está conectado en forma operativa a la segunda secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la segunda secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende un primer promotor conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, un segundo promotor conectado en forma operativa a la segunda secuencia de ácido nucleico, una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico, y una segunda secuencia

de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la segunda secuencia de ácido nucleico.

**[20]** En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia

con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o un complemento de las mismas. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas.

**[21]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido,

siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[22]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[23]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[24]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de

ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[25]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%

de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[26]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:

4, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[27]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección

contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[28]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:

10. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[29]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas

de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[30]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[31]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por

lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico

de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

**[32]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y la segunda secuencia de ácido nucleico

tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12.

**[33]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor y una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14, y en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10,

SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer promotor y el segundo promotor se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[34]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor y una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y en donde el primer promotor y el segundo promotor se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el segundo promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[35]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica

para una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[36]** En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor con capacidad para controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, un segundo promotor con capacidad para controlar la expresión de la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y un tercer promotor con capacidad para

controlar la expresión de la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma. En algunos aspectos, el primer promotor está conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, el segundo promotor está conectado en forma operativa a la segunda secuencia de ácido nucleico, y el tercer promotor está conectado en forma operativa a la tercera secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico, una segunda secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la segunda secuencia de ácido nucleico, y una tercera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la tercera secuencia de ácido nucleico. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende un primer promotor conectado en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, un segundo promotor conectado en forma operativa a la segunda secuencia de ácido nucleico, un tercer promotor conectado en forma operativa a la tercera secuencia de ácido nucleico, una primera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la primera secuencia de ácido nucleico, una segunda secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la segunda secuencia de ácido nucleico, y una tercera secuencia de terminación de la transcripción conectada en forma operativa con la tercera secuencia de ácido nucleico.

**[37]** En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas.

**[38]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 , la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[39]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más

especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[40]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, con una o más inserciones, sustituciones y/o

eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos

aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[41]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de

coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

**[42]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

**[43]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[44]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo

menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[45]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de

ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[46]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de

ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

**[47]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia

con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6.

**[48]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[49]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido

nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el primero, el segundo y el tercero de los promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[50]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en

donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína

MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende un primer promotor con capacidad para controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S, un segundo promotor con capacidad para controlar la expresión de la segunda proteína MoCoV S, y un tercer promotor con capacidad para controlar la expresión de la tercera proteína MoCoV S. En algunos aspectos, el primero, el segundo y el tercero de los promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID

NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[51]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ADN. En algunos aspectos, el polinucleótido de ADN es un polinucleótido de ADN de hebra simple (ADNhs). En algunos aspectos, el polinucleótido de ADN es un polinucleótido de ADN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ARN. En algunos aspectos, el polinucleótido de ARN es un polinucleótido de ARN de hebra simple (ARNhs). En algunos aspectos, el polinucleótido de ARN es un ARN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ADN y ARN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un ARNm. En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5'. En algunos aspectos, el ARNm comprende una 5'-UTR. En algunos aspectos, el ARNm comprende una 3'-UTR. En algunos aspectos, el ARNm comprende una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5' y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 5'-UTR, y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 3'-UTR, y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 5'-UTR, una 3'-UTR, y una poli(A).

**[52]** Ciertos aspectos de la divulgación se relacionan con una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico descrita o ejemplificada en la presente. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped procariota. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped eucariota. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de

mamífero. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de humano. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de levadura. En algunos aspectos, la célula huésped de levadura es una célula huésped de la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*). En algunos aspectos, la célula huésped de levadura es una célula huésped de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o una célula huésped de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

**[53]** Ciertos aspectos de la divulgación se relacionan con una composición (por ejemplo, un vector para vacunas contra el coronavirus, una composición farmacéutica, o una célula huésped) que comprende una construcción de ácido nucleico descrita o ejemplificada en la presente. Los antígenos de las proteínas MoCoV S de la presente divulgación se generaron *in silico* a partir de una compilación de 552 secuencias de proteínas que abarcaban diversas cepas de coronavirus (HCoV-OC43, Beta-coronavirus de murciélago (por ejemplo, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279), SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV (por ejemplo, MERS-CoV-SA-N1, MERS-CoV England-N1), HCoV-NL63, y HCoV-229E). Por lo tanto, los antígenos de proteína MoCoV S de la presente divulgación proveen una amplia protección contra diferentes cepas de coronavirus y coronavirus emergentes y se pueden emplear como una vacuna que se administra como una proteína aislada, una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico aislado o una molécula de ácido nucleico recombinante), o a través de un vehículo de administración o vector, incluyendo un vector viral o partícula similar a virus. En algunos aspectos, el vehículo de administración o vector es un plásmido de ADN, un vector viral, un vector bacteriano, un cósmido, o un cromosoma artificial. En

algunos aspectos, el vector viral es un vector viral heterólogo, por ejemplo, un vector basado en poxvirus (por ejemplo, un virus vacuna tal como MVA), un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de baculovirus, un vector de herpesvirus (por ejemplo, un vector de citomegalovirus (CMV)), un vector de virus de simio 40 (SV40), un vector de papilomavirus, un vector de alfavirus, un vector de virus del tumor mamario de ratón, un vector del virus de la leucemia murina de Moloney, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector viral con replicación defectuosa. En algunos aspectos, el vector viral es una partícula similar a virus. La presente divulgación por lo tanto se relaciona con nuevas construcciones de vacunas contra el coronavirus, y métodos para usar dichas construcciones.

**[54]** En un aspecto, para generar una secuencia mosaico, se emplea un algoritmo genético para generar, seleccionar y recombinar *in silico* potenciales epitopes para células T y/o epitopes para células B, en secuencias de proteínas "mosaico" que son antigénicas y pueden proveer una mayor cobertura de las variantes virales globales en comparación con cualquier proteína de tipo salvaje individual. Los epitopes para células T en general tienen entre aproximadamente 8 y aproximadamente 15 residuos de aminoácido de longitud, y los epitopes para células B en general tienen entre aproximadamente 12 hasta aproximadamente 35 residuos de aminoácido de longitud. La combinación de epitopes en una secuencia de proteína S mosaico de CoV de longitud completa se puede emplear en vectores de ácido nucleico para su administración o para la expresión de proteínas, o también se puede emplear un fragmento de la secuencia que sea inmunogénico o antigénico. Una "parte inmunogénica," "fragmento

inmunogénico,” “parte antigénica,” o “fragmento antigénico” de una secuencia de longitud completa puede tener entre 8 aminoácidos de longitud y hasta uno o más residuos menos que un polipéptido de longitud completa, por ejemplo, una proteína S de longitud completa. En algunos aspectos, una parte inmunogénica, fragmento inmunogénico, parte antigénica, o fragmento antigénico de un polipéptido es un polipéptido que tiene aproximadamente 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la longitud de un correspondiente polipéptido de longitud completa, tal como una proteína S de longitud completa. En algunos aspectos, una parte inmunogénica, fragmento inmunogénico, parte antigénica, o fragmento antigénico de un polipéptido es un polipéptido que induce una respuesta inmunogénica que es por lo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, o más de la respuesta inmunogénica del correspondiente polipéptido de longitud completa. Como se describe en la presente, las secuencias mosaicos pueden incluir residuos característicos en una o más posiciones, y en algunos aspectos, las partes inmunogénicas, fragmentos inmunogénicos, partes antigénicas, o fragmentos antigénicos de las secuencias mosaicos también tienen dicho o dichos residuos característicos.

**[55]** Por lo tanto, la divulgación provee una composición (por ejemplo, un vector para vacunas contra el coronavirus, composición farmacéutica, o una célula huésped) que comprende un polinucleótido (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante) que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o más antígenos de proteína S mosaico como se describe en la presente. En algunos aspectos, la composición (por ejemplo, el vector para vacunas contra el coronavirus, la composición farmacéutica, o la célula huésped)

comprende por lo menos un casete de expresión que tiene un promotor conectado en forma operativa a un marco de lectura abierto heterólogo que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un antígeno de proteína S mosaico descrito en la presente. En algunos aspectos, la composición incluye más de una secuencia nucleotídica, en donde cada una codifica para un antígeno diferente de proteína S, en donde por lo menos uno de los cuales es un antígeno de proteína S mosaico. Por ejemplo, la composición puede incluir más de un poxvirus recombinante vivo, por ejemplo, diferentes aislados que tienen diferentes antígenos o un virus que codifica para más de un antígeno de proteína S. Una vez que un vector viral infecta las células de un animal huésped, el o los antígenos se expresan en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunológica. En un aspecto, un virus recombinante vivo se puede obtener a partir de un cultivo de células de mamífero aisladas transfectadas o transformadas con un genoma viral recombinante que comprende un por lo menos un casete de expresión. Se puede emplear cualquier célula, por ejemplo, cualquier célula de mamífero, tal como una célula de humano, canino, bovino, equino, felino, porcino, ovino, de visón, o de primate no humano, incluyendo células mutantes, que soporte la replicación eficaz del virus para aislar y/o propagar los virus. En otra forma de realización, las células huéspedes son líneas celulares o cepas celulares de mamífero de propagación continua. Los vectores virales útiles para la presente divulgación incluyen a título enunciativo no taxativo un poxvirus recombinante (por ejemplo, un virus vacuna tal como MVA), un adenovirus recombinante, un virus adenoasociado (AAV) recombinante, un retrovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un baculovirus recombinante, un herpesvirus recombinante (por ejemplo, un citomegalovirus

recombinante (CMV)), un virus de simio 40 (SV40) recombinante, un papilomavirus recombinante, un alfavirus recombinante, un virus de tumor mamario de ratón (MMTV) recombinante, un virus de la leucemia murina de Moloney recombinante, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector viral con replicación defectuosa. En algunos aspectos, el vector viral es una partícula similar a virus. Los vectores no virales útiles para la presente divulgación incluyen a título enunciativo no taxativo plásmidos de ADN, vectores bacterianos, cósmidos, y cromosomas artificiales. Los vectores virales y no virales pueden estar presentes en liposomas, por ejemplo, liposomas neutros o catiónicos, tales como los liposomas DOSPA/DOPE, DOGS/DOPE o DMRIE/DOPE, y/o asociados con otras moléculas tales como los complejos de ADN-anticuerpos anti-ADN-lípido catiónico (DOTMA/DOPE).

**[56]** En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende una construcción de ácido nucleico descrita o ejemplificada en la presente y uno o más vehículos que hacen adecuada a la composición para el uso farmacéutico.

**[57]** En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped procariota. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped eucariota. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de mamífero. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de humano. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de levadura. En algunos aspectos, la célula huésped de levadura es una célula huésped de la levadura *P. pastoris*. En algunos aspectos, la célula huésped de levadura es una célula huésped de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o una célula huésped de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. En algunos aspectos, la célula

huésped es una línea celular (por ejemplo, una línea celular de mamífero o una línea celular humana).

**[58]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus comprende un primer polinucleótido que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima

de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[59]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[60]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%,

por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[61]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus además comprende un segundo polinucleótido que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y

cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[62]** En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos

aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[63]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o

el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

**[64]** En algunos aspectos, el segundo polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido

comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12.

**[65]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus además comprende un tercer polinucleótido que codifica para una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epítopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo

menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[66]** En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[67]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[68]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[69]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[70]** En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por

lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[71]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[72]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[73]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, el segundo polinucleótido comprende la

secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[74]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14.

**[75]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos

450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[76]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus además comprende uno o más promotores. En algunos aspectos, el promotor es un promotor inducible. En algunos aspectos, el promotor es un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el uno o más promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor conectado en forma operativa al primer polinucleótido. En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor conectado en forma operativa al primer polinucleótido y un segundo promotor conectado en forma operativa al segundo polinucleótido. En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor conectado en forma operativa al primer polinucleótido, un segundo promotor conectado en forma operativa al segundo polinucleótido, y un tercer promotor conectado en forma operativa al tercer polinucleótido. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7). En algunos aspectos, el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7). En algunos aspectos, el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8). En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[77]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus es un vector viral, un vector no viral, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector basado en poxvirus (por ejemplo, un vector vacuna o un vector vacuna Ankara modificado (MVA)), un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de baculovirus, un vector de herpesvirus (por ejemplo, un vector de citomegalovirus (CMV)), un vector de virus de simio 40 (SV40), un vector de papilomavirus, un vector de alfavirus, un vector de virus del tumor mamario de ratón, un vector del virus de la leucemia murina de Moloney, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector viral con replicación defectuosa. En algunos aspectos, el vector viral es un vector basado en poxvirus. En algunos aspectos, el vector basado en poxvirus es un vector basado en virus vacuna. En algunos aspectos, el vector basado en virus vacuna es un vector basado en virus vacuna Ankara modificado (MVA). En algunos aspectos, el vector viral es una partícula similar a virus. En algunos aspectos, el vector no viral es un plásmido de ADN, un cósmido, un vector bacteriano, un cromosoma artificial, o cualquier combinación de los mismos.

**[78]** La divulgación además provee una vacuna contra el coronavirus que comprende una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y uno o más vehículos, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes

para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[79]** En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus además comprende una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y uno o más vehículos, en donde la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células

T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda

proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

**[80]** En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus además comprende una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y uno o más vehículos, en donde la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, los por lo menos dos coronavirus de humano se seleccionan del grupo que

consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el por lo menos un coronavirus de murciélago se selecciona del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma está optimizada para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[81]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:

1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[82]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

**[83]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[84]** En algunos aspectos, el vehículo es un virus. En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna (por ejemplo, un poxvirus tal como MVA), un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un alfavirus, un lentivirus, un retrovirus, un baculovirus, un herpesvirus, un papilomavirus, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vehículo es un poxvirus. En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna. En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna Ankara modificado (MVA). En algunos aspectos, el vehículo es una partícula similar a virus.

**[85]** Las construcciones de ácido nucleico, composiciones, vectores para vacunas contra el coronavirus, vacunas contra el coronavirus, o proteínas mosaico que se describen o ejemplifican en la presente se pueden administrar mediante cualquier ruta que incluye, a título enunciativo no taxativo, la ruta bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas, y la transferencia a la células huéspedes se puede potenciar usando electroporación y/o iontoforesis.

**[86]** En una forma de realización, una composición de la presente divulgación, tal como un vector para vacunas contra el coronavirus o una vacuna contra el coronavirus, por ejemplo, para administración mucosal o parenteral, que tiene un virus recombinante (por ejemplo, un vector basado en poxvirus, virus vacuna, o

MVA) puede incluir dosis en el rango entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de placas de lisis (PFU) o TCID<sub>50</sub>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  PFU o TCID<sub>50</sub>, la cual se puede administrar como una dosis individual o en dos o más dosis, o cada dosis puede incluir entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  PFU o TCID<sub>50</sub>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  PFU o TCID<sub>50</sub>, de virus recombinante, tal como poxvirus. Por ejemplo, cada dosis puede tener el mismo número de PFU o TCID<sub>50</sub>, o la o las dosis de refuerzo pueden tener mayores o menores cantidades en relación con la dosis (de sensibilización) inicial. La dosis de sensibilización y/o la o las dosis de refuerzo pueden incluir un adyuvante. Además, el vector que se usa para sensibilizar y reforzar puede ser diferente. Por ejemplo, se puede usar un poxvirus (por ejemplo, virus vacuna o MVA) que expresa el antígeno mosaico para una dosis de sensibilización, mientras que se puede usar otro vector viral, vector de ADN, vector de ARN, o proteína para la dosis secundaria, o viceversa.

**[87]** En una forma de realización, una composición de la presente divulgación (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico, un vector para vacunas contra el coronavirus, una vacuna contra el coronavirus, o una composición farmacéutica) codifica o comprende uno o más antígenos de proteína MoCoV S, que pueden inducir una respuesta humoral, una respuesta celular, o ambas, y por lo tanto probablemente provee una protección cruzada. En una forma de realización, la vacuna confiere entre 50 y 100% de protección contra un enfrentamiento heterólogo (protección cruzada). En una forma de realización, la administración de una composición de la presente divulgación a los mamíferos provee una supervivencia aumentada, por ejemplo, después de la exposición a un coronavirus, incluyendo tasas de supervivencia de por lo menos 35% o más, por ejemplo, tasas de supervivencia de 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 99%, o más, en relación con las tasas de supervivencia en ausencia de la administración de esa composición o cualquier otro agente profiláctico o terapéutico. Las composiciones que se describen o ejemplifican en la presente son útiles en forma profiláctica o terapéutica, por ejemplo, contra dos o más cepas de coronavirus.

**[88]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un kit que comprende una construcción de ácido nucleico, una composición farmacéutica, un vector para vacunas contra el coronavirus, o una vacuna contra el coronavirus como se describe o ejemplifica en la presente. En algunos aspectos, el kit además comprende un vial de vidrio. En algunos aspectos, el kit además comprende instrucciones para usar la construcción del ácido nucleico, la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus en un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus. En algunos aspectos, el kit además comprende instrucciones para usar la construcción del ácido nucleico, la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus en un método para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite.

**[89]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus, en donde el método comprende administrar una o más dosis de una composición farmacéutica, un vector para vacunas contra el coronavirus, o una vacuna contra el coronavirus como se describe o ejemplifica en la presente, al sujeto.

**[90]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra el uno o más antígenos de coronavirus. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra los antígenos de coronavirus de por lo menos dos cepas de coronavirus diferentes. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra los antígenos de coronavirus de por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve, por lo menos diez, o por lo menos once cepas de coronavirus diferentes. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus de un coronavirus surgido recientemente.

**[91]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus

son eficaces para inducir una respuesta inmunológica adaptativa en el sujeto contra por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus.

**[92]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus se administran al sujeto mediante una ruta de administración bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas.

**[93]** En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos, el sujeto es un humano.

**[94]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un método para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una o más dosis de una composición farmacéutica, un vector para vacunas contra el coronavirus, o una vacuna contra el coronavirus como se describe o ejemplifica en la presente, al sujeto.

**[95]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus previene, reduce la incidencia, atenúa o trata la infección con una cepa de

coronavirus que se selecciona del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus previene, reduce la incidencia, atenúa o trata la infección con un coronavirus surgido recientemente. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus previene, reduce la incidencia, atenúa o trata la infección con por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco cepas diferentes de coronavirus. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus previene, reduce la incidencia, atenúa o trata la infección con un coronavirus surgido recientemente.

**[96]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus son eficaces para inducir una respuesta inmunológica adaptativa en el sujeto contra por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus.

**[97]** En algunos aspectos, la una o más dosis de la composición farmacéutica, el vector para vacunas contra el coronavirus, o la vacuna contra el coronavirus

se administran al sujeto mediante una ruta de administración bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas.

**[98]** En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos, el sujeto es un humano.

**[99]** En algunos aspectos, en la presente se provee una composición que comprende una nanopartícula lipídica y un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que comprende una primera secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la primera secuencia nucleotídica codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13.

**[100]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 99 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[101]** En algunos aspectos, el ORF del párrafo 99 además comprende una segunda secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4,

SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la segunda secuencia nucleotídica codifica para un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda secuencia polinucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[102]** En algunos aspectos, el ORF del párrafo 99 además comprende una tercera secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la tercera secuencia nucleotídica codifica para un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera secuencia polinucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[103]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 99 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 12 y codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

**[104]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 99 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 12 y codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 11; en donde la segunda secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 4 y codifica para un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y en donde la tercera secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 6 y codifica para un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

**[105]** En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica del párrafo 99 comprende un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico, un esteroI, un lípido catiónico ionizable, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el ARNm comprende una región no traducida (UTR) en el extremo 5' y una UTR 3'. En algunos aspectos, el ARNm comprende una modificación química.

#### **4. DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS**

**[106]** En la Figura 1 (FIG. 1) se provee un árbol filogenético de los coronavirus (CoV). El árbol muestra los CoV divididos en tres grupos filogenéticos distintos, definidos como  $\alpha$ -CoV,  $\beta$ -CoV y  $\gamma$ -CoV. Para el diseño de las proteínas de la espícula (S) mosaico de CoV (MoCoV) que se describen o ejemplifican en la presente, se usaron secuencias de cepas de coronavirus humanos (HCoV) (cajas con línea continua), cepas de coronavirus de murciélago (BtCoV) (cajas con línea discontinua), y secuencias de COVID-19.

**[107]** En las Figuras 2A-2B (FIGS. 2A-2B) se provee un ejemplo de estrategia con vacuna mosaico contra el coronavirus.

**[108]** En las Figuras 3A-3G (FIGS. 3A-3G) se proveen esquemas de cinco ejemplos de vectores VMA recombinantes capaces de expresar una o más proteínas MoCoV S. El primer ejemplo de vector MVA recombinante (MVA-

MoCoV-M2-M3) contiene un casete de expresión MoCoV-M2-M3 insertado en el locus de hemaglutinina (HA) del MVA (FIG. 3A). El segundo ejemplo de vector MVA recombinante (MVA-MoCoV-MB) contiene un casete de expresión MoCoV-MB insertado en el locus de timidina quinasa (TK) del MVA (FIG. 3B). El tercer ejemplo de vector MVA recombinante (MVA-MoCoV-MB-M2-M3) contiene tanto el casete de expresión MoCoV-MB insertado en el locus TK de MVA como el casete de expresión MoCoV-M2-M3 insertado en el locus HA del MVA (FIG. 3C). El cuarto ejemplo de vector MVA recombinante (MVA-MoCoV-M4) contiene un casete de expresión MoCoV-M4 insertado en el locus TK del MVA (FIG. 3D). El quinto ejemplo de vector MVA recombinante (MVA-MoCoV-M4-M2-M3) contiene tanto el casete de expresión MoCoV-M4 insertado en el locus TK del MVA como el casete de expresión MoCoV-M2-M3 insertado en el locus HA del MVA (FIG. 3E). Los casetes de expresión insertados en el locus TK tienen la capacidad de expresar la proteína MoCoV S MB o M4 a partir de un promotor E/L de S y además codifican para la GFP (proteína fluorescente verde) como marcador de detección y la GPT (xantina guanina fosforribosil transferasa) como marcador de selección (FIGS. 3B, 3C, 3D, y 3E). El casete de expresión insertado en el locus HA es capaz de expresar la proteína MoCoV S de M2 a partir de un promotor E/L de S y la proteína MoCoV S de M3 a partir de un promotor de LEO y además codifica para un gen mCherry (proteína fluorescente) como marcador de detección (FIGS. 3A, 3C, y 3E).

**[109]** En la Figura 4 (FIG. 4) se muestra la expresión de la proteína MoCoV S a partir del vector MVA-MoCoV-MB-M2-M3 recombinante por análisis por transferencia Western usando suero de humanos convalecientes (anticuerpo primario) y un anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP (anticuerpo

secundario). Se usó 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para visualizar la proteína S mosaico en las membranas. La Calle 1 representa la proteína cosechada a partir de las células DF-1 infectadas con el MVA control negativo usando solución amortiguadora de Laemmli. La Calle 2 representa el marcador de tamaño comercial en KB. La Calle 3 representa la proteína cosechada a partir de las células DF-1 infectadas con el vector MVA-MoCoV-MB recombinante usando solución amortiguadora de Laemmli. La Calle 4 representa la proteína cosechada a partir de las células DF-1 infectadas con el vector MVA-MoCoV-MB-M2-M3 recombinante usando solución amortiguadora de Laemmli. La Calle 5 representa la proteína de la espícula (S) de SARS-CoV-2 comercial. “\*\*” indica las bandas de proteína que corresponden a la proteína de MB. “\*\*\*” indica las bandas de proteína que corresponden a la proteína M2 o M3.

**[110]** En las Figuras 5A-5C (FIGS. 5A-5C) se proveen las tablas de uso de codones para los organismos ejemplificativos. La frecuencia con que se usa cada codón se expresa como una fracción decimal.

**[111]** En las Figuras 6A-6E (FIGS. 6A-6E) se muestra la eficacia de las vacunas de MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 contra el enfrentamiento con el aislado de SARS-CoV-2 Washington en un modelo de ratón K18-hACE2.

**[112]** En la Figura 6A (FIG. 6A) se provee un ejemplo de curso temporal para analizar la eficacia de las vacunas que se describen en la presente a lo largo de un periodo de 10 semanas en una cohorte de 10 ratones. Alrededor de tres semanas después de la primera dosis de la vacuna ( $5 \times 10^7$  PFU), se puede administrar una segunda dosis opcional de la vacuna. Se miden los títulos de anticuerpo a las tres semanas después de la primera dosis y a las cinco semanas después de la primera dosis. Alrededor de cinco semanas después de la primera

dosis de la vacuna, se enfrenta a los ratones por vía intranasal con SARS-CoV-2. Cinco días después del enfrentamiento, se sacrifica la mitad de la cohorte y se analiza la carga viral en tejido pulmonar por PCR cuantitativa en tiempo real. 10 días después del enfrentamiento, se sacrifica la otra mitad de la cohorte y se analiza la carga viral en tejido pulmonar por PCR cuantitativa en tiempo real.

**[113]** En la Figura 6B (FIG. 6B) se muestra la media de la variación de peso diario (%) que cubre un periodo de diez días en los ratones K18-hACE2 después de un enfrentamiento intranasal con SARS-CoV-2 de acuerdo con el curso temporal de la FIG. 6A. Los ratones K18-hACE2 recibieron la vacuna de MVA-MoCoV-MB (línea con marcadores de círculos vacíos para la dosis individual y línea con marcadores de diamante para los animales que recibieron una segunda dosis) o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (línea con marcadores triangulares para una dosis individual y línea con marcadores de círculos rellenos para los animales que recibieron una segunda dosis). La línea con marcadores cuadrados representa los ratones K18-hACE2 que recibieron PBS.

**[114]** En la Figura 6C (FIG. 6C) se muestra la probabilidad de supervivencia de los ratones K18-hACE-2 vacunados durante 10 días después del enfrentamiento con  $1 \times 10^5$  PFU del SARS-CoV-2 USA-WA1/2020.

**[115]** En la Figura 6D (FIG. 6D) se muestran la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones K18-hACE2 antes de la segunda dosis opcional (21 días después de la vacuna) que actúa como un refuerzo de acuerdo con la medida por pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (PRNT). Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[116]** En la Figura 6E (FIG. 6E) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones K18-hACE2 antes del enfrentamiento (35 días después de la vacuna) con el aislado de SARS-CoV-2 Washington de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[117]** En las Figuras 7A-7C (FIGS. 7A-7C) se muestra la eficacia de las vacunas de MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 contra el enfrentamiento con la variante sudafricana del SARS-CoV-2 en un modelo de ratón K18-hACE2.

**[118]** En la Figura 7A (FIG. 7A) se muestra la media de la variación (%) del peso diario cubriendo un periodo de cinco días para los ratones C57BL6J vacunados que recibieron los candidatos de vacuna MVA-MoCoV-MB (una dosis – línea con marcadores de círculos vacíos), refuerzo con MVA-MoCoV-MB (2 dosis – línea con marcadores de círculos rellenos), MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (1 Dosis – línea con marcadores triangulares rellenos), refuerzo con MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (2 dosis – línea con marcadores triangulares vacíos), Proteína de la Espícula-GLA (2 dosis – línea con marcadores cuadrados) y solución amortiguadora (PBS – línea con marcadores de diamante). Los ratones se monitorearon durante cuatro días después del enfrentamiento con  $6 \times 10^4$  PFU de SARS-CoV-2 hCoV-19/Sudáfrica/KRISP-K005325/2020.

**[119]** En la Figura 7B (FIG. 7B) se muestra la probabilidad de supervivencia de los ratones C57BL6J vacunados durante seis días después del enfrentamiento con  $6 \times 10^4$  PFU de SARS-CoV-2 hCoV-19/Sudáfrica/KRISP-K005325/2020.

**[120]** En la Figura 7C (FIG. 7C) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones C57/BL6 antes de la segunda dosis opcional (21 días después de la vacunación) que actúa como refuerzo de acuerdo con la

medida por pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (PRNT). Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[121]** En la Figura 7D (FIG. 7D) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones C57/BL6 antes del enfrentamiento (35 días después de la vacunación) con la variante sudafricana del SARS-CoV-2 de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[122]** En la Figura 8A (FIG. 8A) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones C57/BL6 antes del enfrentamiento (35 días después de la vacunación) con la variante Delta del SARS-CoV-2 de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[123]** En la Figura 8B (FIG. 8B) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones K18-hACE2 antes del enfrentamiento (35 días después de la vacunación) con la variante Delta del SARS-CoV-2 de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[124]** En la Figura 9A (FIG. 9A) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones C57/BL6 antes del enfrentamiento (35 días después de la vacunación) con la variante Mu del SARS-CoV-2 de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[125]** En la Figura 9B (FIG. 9B) se muestra la media de los títulos de anticuerpos neutralizantes en los ratones K18-hACE2 antes del enfrentamiento (35 días

después de la vacunación) con la variante Mu del SARS-CoV-2 de acuerdo con la medida por PRNT. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[126]** En la Figura 10A (FIG. 10A) se muestra la carga viral (copias de ARN/g) en los pulmones de los ratones C57/BL6 después del enfrentamiento con el aislado Washington de SARS-CoV-2. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3. La carga viral se midió por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados se presentan como la media geométrica e Intervalo de Confianza de 95%. Los grupos se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis. Para las comparaciones múltiples, se usó la prueba de Dunns. La línea en cuadrícula representa el Límite de Detección de la qRT-PCR.

**[127]** En la Figura 10B (FIG. 10B) se muestra la carga viral (copias de ARN/g) en los pulmones de los ratones K18-hACE2 después del enfrentamiento con el aislado Washington de SARS-CoV-2. Se vacunaron los ratones con la vacuna de MVA-MoCoV-MB o la vacuna de MVA-MoCoV-MB-M2-M3. La carga viral se midió por qRT-PCR. Los resultados se presentan como la media geométrica e Intervalo de Confianza de 95%. Los grupos se compararon usando la prueba de Kruskal-Wallis. Para las comparaciones múltiples, se usó la prueba de Dunns. La línea en cuadrícula representa el Límite de Detección de la qRT-PCR.

**[128]** En la Figura 11A (FIG. 11A) se muestran los títulos de SARS-CoV-2 infeccioso en los pulmones de los ratones C57/BL6J vacunados de acuerdo con la medida por ensayo de formación de focos de lisis.

**[129]** En la Figura 11B (FIG. 11B) se muestran los títulos de SARS-CoV-2 infeccioso en los pulmones de los ratones K18-hACE2 vacunados de acuerdo con la medida por ensayo de formación de focos de lisis.

**[130]** En la Figura 12A (FIG. 12A) se provee un ejemplo de curso temporal para el análisis de la eficacia de las vacunas que se describen en la presente a lo largo de un periodo de 5 semanas en una cohorte de 5 primates no humanos. Aproximadamente tres semanas después de la primera dosis de la vacuna, se puede administrar una segunda dosis opcional de la vacuna.

**[131]** En la Figura 12B (FIG. 12B) se muestran los títulos de anticuerpos en primates no humanos tres o cinco semanas después de la primera dosis.

**[132]** En la Figura 13 (FIG. 13) se muestra una transferencia Western de la construcción recombinante MVA-MoCoV-M4 en las calles 2 a 5. La Calle 1 es un estándar de proteínas. Las calles 6-7 son el MVA parental. La Calle 8 muestra un control positivo con la proteína de la espícula recombinante.

**[133]** En la Figura 14 (FIG. 14) se muestra el cambio de peso corporal a lo largo de un periodo de tiempo después de la vacunación en animales que recibieron MVA-MoCoV-M4 (administración intranasal, intramuscular u oral), MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (administración intranasal, intramuscular u oral), o PBS (administración intramuscular).

**[134]** En la Figura 15 (FIG. 15) se muestra la supervivencia global a lo largo de un periodo de tiempo después de enfrentamiento letal para los animales que recibieron MVA-MoCoV-M4 (administración intranasal, intramuscular u oral), MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (administración intranasal, intramuscular u oral), o PBS (administración intramuscular).

## **5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN**

### **5.1 Síntesis**

**[135]** Los virus que tienen codificado su genoma por ARN, tales como los coronavirus, tienden a mutar fácilmente a medida que se dispersan a lo largo de la población huésped. Este hecho puede tener un impacto significativo en la eficacia de cualquier candidato de vacuna contra el SARS-CoV-2 que se encuentre actualmente en desarrollo ya que estos se diseñaron con secuencias obtenidas de virus aislados al inicio de la pandemia por COVID-19. Incluso después de que la pandemia por COVID-19 se encuentre bajo control, existe una posibilidad alta de que vuelvan a surgir variantes de SARS-CoV-2 que provoquen olas epidémicas periódicas. Para superar el problema de las variantes reemergentes de variantes de SARS-CoV-2 y el futuro surgimiento de nuevas cepas de coronavirus, se requiere una vacuna contra el coronavirus única de amplia protección o universal.

**[136]** En un esfuerzo por desarrollar vacunas que maximicen la representación de rasgos antigénicos presentes en diversas poblaciones virales, se han propuesto una serie de estrategias. Las estrategias han incluido concatenar epitopes para células T comúnmente reconocidos (Palker y col., *J Immunol.* 142(10):3612-3619 (1989)), creando cadenas de pseudoproteínas de epitopes para células T (De Groot y col., *Vacuna* 23(17-18):2136-2148 (2005)), y generando conjuntos de péptidos solapantes consenso de proteínas (Thomson y col., *Vacuna* 23(38):4647-4657 (2005)). También se han propuesto estrategias evolutivas tales como el uso de secuencias consenso (Gao y col., *J Virol.* 79(2):1154-1163 (2005); Gaschen y col., *Science* 296(5577):2354-2360 (2002)), y la de ancestro común más reciente (MRCA) de poblaciones virales, con la

suposición de que estas estrategias capturan la diversidad viral (Gaschen y col., 2002). Desafortunadamente, los estudios experimentales en modelos animales con el uso de estas estrategias han documentado respuestas inmunológicas humorales y celulares insignificantes (Doria-Rose y col., *J Virol.* 79(17):11214-11224 (2005); Gao y col., 2005)).

**[137]** Los alineamientos de secuencias se basan en la obtención de una secuencia "consenso", en donde se incorporan varias secuencias genéticas en una secuencia única. De esta manera, una secuencia consenso puede minimizar la distancia genética entre las capas para vacunas y los virus, y por lo tanto puede ejercer respuestas inmunológicas con mayor reactividad cruzada en comparación con un inmunógeno derivado de cualquier coronavirus individual. La estrategia de secuencia consenso es limitada ya que la secuencia consenso depende de las secuencias ingresadas, las que habitualmente son bases de datos con fuerte sesgo (por ejemplo, sesgos de recolección temporal y espacial) en base a cómo se informan las secuencias a una base de datos, tal como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias que más se informan al NCBI no son necesariamente representativas de las cepas circulantes. En consecuencia, la secuencia consenso sintética no representa necesariamente la diversidad circulante en la actualidad. Además, debido a que una secuencia consenso es 100% sintética, podría no ser "correcta" funcional o conformacionalmente.

**[138]** Por el contrario, la presente divulgación emplea una estrategia de antígeno mosaico para generar secuencias de proteínas de la espícula mosaico usando un mecanismo de puntuación de objetivos que optimiza la cobertura máxima de epítopes para células T de una diversidad amplia de coronavirus de

tipo salvaje. Se ha aplicado una estrategia de antígeno mosaico en el desarrollo de vacunas contra el virus de influenza, VIH y virus del dengue. Denis, J., y col., *Vacuna* 26(27-28):3395-3403 (2008); Hou, J., y col., *Front Immunol.* 10:1429 (2019); Florek, N.W., y col., *PLoS One* 12(8):e0181738 (2017); Kamlangdee, A., y col., *J Virol.* 88(22):13300-13309 (2014); Kamlangdee, A., y col., *J Virol.* 90(15):6771-6783 (2016). Esta se basa en algoritmos *in silico* que generan secuencias que incluyen la máxima diversidad de epitopes para células T potenciales de las secuencias naturales; por lo tanto, los mosaicos se parecen a las proteínas naturales pero excluyen los epitopes de baja frecuencia que son irrelevantes para las cepas circulantes. Debido a la alta diversidad genética presente en las cepas de coronavirus, ha sido difícil obtener vacunas polivalentes contra el coronavirus. En este sentido, la estrategia de vacuna mosaico es una herramienta potente para competir contra la diversidad de los coronavirus ya que se diseña para cubrir los diversos epitopes en una población diana y para inducir una respuesta inmunológica más amplia.

**[139]** De esta manera la presente divulgación provee vacunas contra el coronavirus ampliamente protectoras o universales que comprenden o expresan proteínas S mosaico de coronavirus o fragmentos antigénicos de las mismas que fueron desarrolladas *in silico* a partir de más de cinco mil secuencias publicadas de coronavirus de humano y murciélago usando una estrategia de antígeno mosaico. Las vacunas contra el coronavirus descritas en la presente tienen como intención no solo proteger contra las cepas de coronavirus actualmente circulantes sino también contra las cepas de coronavirus nuevas emergentes, tales como las nuevas cepas de SARS-CoV-2 que surgirán de la actual pandemia por COVID-19.

[140] En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos un (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o cualquier

combinación de las mismas. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas de la presente divulgación comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o cualquier combinación de las mismas.

**[141]** Ciertos aspectos de la presente divulgación están relacionados con una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido aislado o una molécula de ácido nucleico recombinante) que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente. En algunos aspectos, la una o más secuencias de ácido nucleico tienen por lo menos 90%, (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, la una o más secuencias de ácido nucleico tienen la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o cualquier combinación de las mismas.

**[142]** Ciertos aspectos de la divulgación se relacionan con composiciones farmacéuticas, células huéspedes y vectores para vacunas contra el coronavirus que comprenden una construcción de ácido nucleico descrita o ejemplificada en la presente.

**[143]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un vector para vacunas contra el coronavirus que comprende uno o más polinucleótidos que codifican para una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente. En algunos aspectos, la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, el uno o más polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90%, (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, el uno o más polinucleótidos comprenden la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o cualquier combinación de las mismas.

**[144]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un vacuna contra el coronavirus que comprende una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas que se describen o ejemplifican en la presente y uno o más vehículos.

**[145]** Ciertos aspectos de la divulgación se relacionan con kits que comprenden una construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, o vacuna contra el coronavirus descrita o ejemplificada en la presente.

**[146]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus, en donde el método comprende administrar una o más dosis de una composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, o vacuna contra el coronavirus descrita o ejemplificada en la presente al sujeto.

**[147]** Ciertos aspectos de la divulgación están relacionados con un método para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una o más dosis de una composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, o vacuna contra el coronavirus descrita o ejemplificada en la presente al sujeto.

## **5.2 Definiciones**

**[148]** Con el objetivo de que la presente divulgación pueda ser comprendida más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Tal como se usa en esta solicitud, excepto que en la presente se indique lo contrario de forma expresa, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado descrito más adelante. A lo largo de la solicitud se describen definiciones adicionales.

**[149]** El término "y/o" cuando se usa en la presente se debe tener en cuenta como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes que se especifican, con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en la presente tiene como intención incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). De manera similar, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" tiene como intención abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

**[150]** Se comprende que siempre que se describan aspectos de la presente con la expresión "que comprende", también se proveen aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

**[151]** Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" o "alrededor de", aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado y que está dentro de un rango de valores que caen dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor que o menor) desde el valor de referencia indicado a menos, que se indique de otra manera o que resulte evidente del contexto (excepto cuando dicho número excediera el 100% de un valor posible). Cuando el término "aproximadamente" o "alrededor de" se aplica en la presente a un valor particular, también se describe en la presente el valor sin el término "aproximadamente" o "alrededor".

**[152]** Como se describe en la presente, se debe comprender que cualquier rango de concentraciones, rango de porcentajes, rango de proporciones o rango de números enteros incluye al valor de cualquier número entero en el rango

indicado y, cuando resulte apropiado, a las fracciones del mismo (tal como un décimo y un céntimo de un número entero), a menos que se indique de otra manera.

**[153]** Como se usan en la presente, los términos "ug" y "uM" se usan como sinónimos de "µg" y "µM", respectivamente.

**[154]** Las unidades, prefijos y símbolos se indican en la forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen al rango. Los títulos de la presente no se proveen como limitaciones de los diferentes aspectos de la divulgación, las que se pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de manera más completa en referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

**[155]** Como se usa en la presente, el término "coronavirus" o "CoV" se refiere al nombre común de *Coronaviridae*. En los humanos, el CoV provoca infecciones respiratorias, las cuales típicamente son leves pero pueden ser letales en formas raras tales como el SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo)-CoV, el MERS (Síndrome respiratorio del Este Medio)-CoV, y SARS-CoV-2. El CoV tiene una nucleocápside de simetría helicoidal y el tamaño del genoma varía en un rango entre aproximadamente 26 y aproximadamente 32 kilobases. Otros CoV de humano ejemplificativos incluyen a CoV 229E, CoV NL63, CoV OC43, CoV HKU1 y CoV HKU20. Los coronavirus de murciélago ejemplificativos incluyen a BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. La envoltura del CoV porta contiene glicoproteínas: proteína de la espícula (S) (de unión a receptor, fusión celular, antígeno principal); proteína de la envoltura (E) (proteína asociada a la envoltura, pequeña); y proteína de la

membrana (M) (de brotación y formación de envoltura). En unos pocos tipos de CoV, existe una cuarta glicoproteína: la proteína hemaglutinina-esterasa (HE). El genoma tiene un protector metilado en el extremo 5' y una poli-A en el extremo 3', y funciona directamente como ARNm. La entrada del CoV a la célula humana se produce a través de endocitosis y fusión de membranas; y la replicación se produce en el citoplasma de la célula. Los CoV se transmiten a través de los aerosoles de las secreciones respiratorias, por ruta fecal-oral y mediante transmisión mecánica. La mayor parte del crecimiento del virus se produce en las células epiteliales. Ocasionalmente, pueden infectarse el hígado, los riñones, el corazón o los ojos, así como también otros tipos de células como los macrófagos.

**[156]** Como se usa en la presente, el término “SARS-CoV-2” se refiere a la cepa de coronavirus que provoca la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), la enfermedad respiratoria responsable de la pandemia por COVID-19. De acuerdo con la taxonomía, el SARS-CoV-2 es un miembro del subgénero *Sarbecovirus* (linaje B de beta-CoV) y es una cepa del SARS-CoV. Se cree que tiene un origen zoonótico y posee similitud genética estrecha con el coronavirus de murciélago, lo que sugiere que surgió de un virus transmitido por los murciélagos. Su secuencia de ARN tiene aproximadamente 30.000 bases de longitud. El SARS-CoV-2 es único entre los betacoronavirus conocidos por su incorporación de un sitio de escisión polibásico, una característica que se sabe que en otros virus aumenta la patogenicidad y la transmisibilidad. Al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV-2 tiene cuatro proteínas estructurales, las proteínas S (espícula), E (envoltura), M (membrana), y N (nucleocápside). La proteína N soporta al genoma de ARN, y las proteínas S, E y M crean en conjunto la envoltura viral.

La proteína de la espícula es la proteína responsable de permitir que el virus ataque y se fusione con la membrana de una célula huésped; específicamente, su subunidad S1 cataliza la unión y la subunidad S2 la fusión. Los experimentos de modelado de proteínas sobre la proteína de la espícula del virus han sugerido que el SARS-CoV-2 tiene afinidad suficiente por el receptor enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) en las células humanas y lo usa como mecanismo de entrada a la célula. Véase Xu, X, y col., *Science China Life Sciences*, 63(3):457-60 (2020). El SARS-CoV-2 también puede usar la basigina para asistir a la entrada a la célula. Véase Wang, K., y col., *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.03.14.988345 (2020).

**[157]** Como se usa en la presente, el término “aislado” se refiere a la preparación y/o aislamiento *in vitro* de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido, vector o plásmido), péptido o polipéptido (proteína), o virus de la divulgación, de manera que no esté asociado con sustancias *in vivo* o que esté sustancialmente purificado de sustancias *in vitro*. La preparación de un virus aislado en general se logra mediante el *in vitro* y propagación cultivo y en forma sustancialmente libre de otros agentes infecciosos.

**[158]** Un virus “recombinante” es uno que ha sido manipulado *in vitro*, por ejemplo, usando técnicas de ADN recombinante, para introducir cambios en el genoma viral.

**[159]** Como se usa en la presente, el término “construcción” se refiere a una molécula de ácido nucleico de cualquier longitud (por ejemplo, ADN de hebra simple o de hebra doble, ARN de hebra simple o de hebra doble, ADN-ARN de hebra doble, polinucleótidos que comprenden uno o más análogos fosfoéster, ARNm, ARNip, ARNi), un plásmido, un vector no viral (por ejemplo, un vector

bacteriano, un vector de levaduras, un cósmido, un cromosoma artificial), un vector viral (por ejemplo, un virus recombinante, tal como un virus MVA recombinante), una partícula similar a virus, una célula o un tejido huésped. Las construcciones de la presente divulgación pueden incluir cualquier número de elementos de transcripción o traducción adecuados, que incluyen, a título enunciativo no taxativo, promotores constitutivos o inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, y terminadores de la transcripción.

**[160]** Los términos "ácidos nucleicos", "moléculas de ácido nucleico", "nucleótidos", "secuencia o secuencias de nucleótidos", y "polinucleótido" se pueden usar como sinónimos y se refieren a la forma polimérica de éster de fosfato de los ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN", que incluyen ARNm) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquier análogo fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma de hebra simple, o una hélice de hebra doble. Las secuencias de ácido nucleico de hebra simple se refieren a ADN de hebra simple (ADNhs) o polinucleótido de ARN de hebra simple (ARNhs). También son posibles las hélices de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN de hebra doble. El término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por lo tanto, este término incluye al ADN de hebra doble que se encuentra, entre otras, en moléculas de ADN lineal o circular (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos, ADN superenrollados y cromosomas. En la descripción de la estructura de moléculas de ADN de hebra doble particulares, las secuencias se pueden describir en la

presente de acuerdo con la convención normal de proveer solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcripta de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sido sometida a manipulación biológica molecular. El ADN incluye, a título enunciativo no taxativo, ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN sintético, y ADN semisintético. Una "composición de ácido nucleico" o "construcción de ácido nucleico" de la divulgación comprende uno o más ácidos nucleicos como se describe en la presente.

**[161]** El ARN se puede obtener mediante la transcripción de una secuencia de ADN, por ejemplo, dentro de una célula. En células eucariotas, la transcripción típicamente se lleva a cabo dentro del núcleo o en la mitocondria. *In vivo*, la transcripción del ADN habitualmente genera un ARN pre maduro, que tiene que ser procesado a ARN mensajero (ARNm). El procesamiento del ARN pre maduro, por ejemplo, en organismos eucariotas, comprende una variedad de diferentes modificaciones postranscripcionales tales como corte y empalme, protección del extremo 5', poliadenilación, exportación desde el núcleo o la mitocondria y similares. La suma de estos procesos también se denomina maduración del ARN. El ARNm maduro habitualmente provee la secuencia nucleotídica que puede ser traducida a una secuencia de aminoácidos de un péptido, proteína o antígeno proteico particular. Típicamente un ARNm maduro comprende una protección en el extremo 5', opcionalmente una 5'-UTR, un marco de lectura abierto, opcionalmente una 3'-UTR, y una secuencia de poli(A).

**[162]** El término "protección en el extremo 5'", como se usa en la presente, se refiere a una entidad, típicamente una entidad de nucleótido modificado, el cual

en general “protege” el extremo 5' de un ARNm maduro. Una protección en el extremo 5' típicamente se puede formar mediante un nucleótido modificado, particularmente mediante un derivado de un nucleótido de guanina. En algunos aspectos, la protección en el extremo 5' se une al extremo 5' terminal mediante una unión 5'-5'-trifosfato. La protección en el extremo 5' puede estar metilada, por ejemplo, m<sup>7</sup>GpppN, en donde N es el nucleótido 5' terminal del ácido nucleico que porta la protección del extremo 5', típicamente el extremo 5' terminal de un ARN. La protección en el extremo 5' de origen natural es m<sup>7</sup>GpppN.

**[163]** Como se usa en la presente, una “secuencia de poli(A)”, también llamada “cola poli(A)” o “cola poli(A) 3'”, típicamente se refiere a una secuencia de nucleótidos de adenina, por ejemplo, de hasta aproximadamente 400 nucleótidos de adenina. Una secuencia de poli(A) puede estar localizada en el extremo 3' terminal de un ARNm. En algunos aspectos, una secuencia de poli(A) también puede estar localizada en un ARNm o cualquier otra molécula de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, en un vector, por ejemplo, en un vector que sirve como molde para la generación de un ARN, preferiblemente un ARNm, por ejemplo, mediante la transcripción del vector. En algunos aspectos, una secuencia de poli(A) está presente en la 3'-UTR del ARNm como se define en la presente.

**[164]** En algunos aspectos, una secuencia 3'-UTR es parte de un ARNm, que se localiza entre la región codificante de la proteína (es decir el marco de lectura abierto) y el extremo 3' terminal de la molécula de ARNm. Si se agrega una secuencia de poli(A) en el extremo 3' terminal ('cola poli(A)') al ARN (por ejemplo mediante poliadenilación), entonces el término 3'-UTR puede referirse a esa parte de la molécula, que se localiza entre la región codificante de la proteína y la secuencia de poli(A) 3' terminal. En algunos aspectos, una 3'-UTR también

puede comprender una secuencia de poli(A) (por ejemplo, una secuencia de poli(A) que no está localizada exactamente en el extremo 3' de la molécula de ARN). Una 3'-UTR del ARNm no se traduce a una secuencia de aminoácidos. La secuencia de la 3'-UTR en general está codificada por el gen, que es transcripta al respectivo ARNm durante el proceso de expresión del gen. La secuencia genómica primero se transcribe a un ARNm pre maduro, el cual comprende intrones opcionales. El ARNm pre maduro luego se procesa a ARNm maduro en un proceso de maduración. Este proceso de maduración comprende los pasos de protección en el extremo 5', corte y empalme del ARNm pre maduro para escindir los intrones opcionales y modificaciones en el extremo 3', tal como la poliadenilación del extremo 3' del ARNm pre maduro y escisión opcional por endo/exonucleasas, etc. En algunos aspectos, una 3'-UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro que se localiza en dirección 3' desde el codón de terminación de la región codificante de la proteína (por ejemplo, inmediatamente del lado 3' desde el codón de terminación de la región codificante de la proteína), y que se extiende hacia el extremo 3' de la molécula de ARN o hacia el lado 5' de una secuencia de poli(A) 3' terminal (por ejemplo, hacia el nucleótido inmediatamente en dirección 5' desde el extremo 3' o inmediatamente en dirección 5' desde la secuencia de poli(A) 3' terminal). El término "corresponde a" se refiere a que la secuencia 3'-UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm usada para definir la secuencia de 3'-UTR, o una secuencia de ADN, que corresponde a dicha secuencia de ARN. En algunos aspectos, el término "una 3'-UTR de un gen", tal como "3'-UTR de la globina alfa o beta", es la secuencia, que corresponde a la 3'-UTR del ARNm maduro derivado de este gen, es decir el ARNm obtenido por

la transcripción del gen y maduración del ARNm pre maduro. El término "3'-UTR de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la 3'-UTR. En algunos aspectos, la 3'-UTR deriva de un gen que se relaciona con un ARNm con una vida media aumentada (es decir, que provee un ARNm estable), por ejemplo una 3'-UTR de un gen seleccionado del grupo que consiste en: un gen de albúmina, un gen de  $\alpha$ -globina, un gen de  $\beta$ -globina, un gen de tirosina hidroxilasa, un gen de lipooxigenasa y un gen de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I).

**[165]** Una 5'-UTR típicamente se refiere a una sección particular del ARN mensajero (ARNm). Se ubica en dirección 5' desde el marco de lectura abierto del ARNm. En algún aspecto, la 5'-UTR comienza con el sitio de inicio de la transcripción y termina un nucleótido antes del codón de inicio del marco de lectura abierto. La 5'-UTR puede comprender elementos para controlar la expresión génica, también llamados elementos reguladores. Dichos elementos reguladores pueden ser, por ejemplo, sitios de unión al ribosoma o un Tracto Terminal de Oligopirimidina de extremo 5'. La 5'-UTR se puede modificar postranscripcionalmente, por ejemplo mediante el agregado de una protección en el extremo 5'. En algunos aspectos, una 5'-UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro que está ubicada entre la protección en el extremo 5' y el codón de inicio. En algunos aspectos, la 5'-UTR corresponde a la secuencia que se extiende desde un nucleótido ubicado en dirección 3' desde la protección en el extremo 5' (por ejemplo, desde el nucleótido ubicado inmediatamente del lado 3' desde la protección en el extremo 5') al nucleótido ubicado del lado 5' desde el codón de inicio de la región codificante de la proteína (por ejemplo, el nucleótido ubicado inmediatamente del lado 5' desde el codón de inicio de la

región codificante de la proteína). El nucleótido ubicado inmediatamente del lado 3' desde la protección en el extremo 5' de un ARNm maduro típicamente corresponde al sitio de inicio de la transcripción. El término "corresponde a" se refiere a que la secuencia de la 5'-UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como la secuencia de ARNm usada para definir la secuencia de la 5'-UTR, o una secuencia de ADN que corresponde a dicha secuencia de ARN. En algunos aspectos, el término "una 5'-UTR de un gen", es la secuencia que corresponde a la 5'-UTR del ARNm maduro derivada de este gen.

**[166]** Como se usa en la presente, el término "transfectar" o "transfección" se refieren al transporte de ácidos nucleicos desde el ambiente externo a una célula hacia el ambiente celular interno, con referencia particular al citoplasma y/o núcleo de la célula. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se comprende que los ácidos nucleicos se pueden administrar a las células después de ser encapsulados o adheridos a uno o más complejos de polímero catiónico/ácido nucleico o de ser atrapados dentro de ellos. Ciertos casos de transfección proveen un ácido nucleico a un núcleo celular. Los ácidos nucleicos incluyen a ADN y ARN así como también a congéneres sintéticos de los mismos. Dichos ácidos nucleicos incluyen nucleótidos de sentido erróneo, antisentido, sin sentido, así como también nucleótidos productores de proteínas, nucleótidos de encendido y apagado y reguladores de la velocidad que controlan la producción de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. En particular, a título enunciativo no taxativo, estos pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semisintéticas, y de origen natural o artificial. Además, el ácido nucleico puede tener un tamaño variable, en el rango entre oligonucleótidos y cromosomas. Estos ácidos nucleicos pueden ser

de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, viral o sintético. Se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida para un experto en la materia.

**[167]** Como se usa en la presente, una célula “transformada” es una célula (tal como una célula de levaduras, por ejemplo una célula de *Pichia pastoris*) en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. El término abarca a todas las técnicas mediante las cuales se podría introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos, e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

**[168]** Como se usa en la presente, el término “levaduras” se refiere a un hongo unicelular que se reproduce de manera asexual. En el contexto de la presente divulgación, se puede usar cualquier tipo apropiado de especie o cepa de levadura para expresar una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe en la presente. En algunos aspectos, la levadura es *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*.

**[169]** Como se usa en la presente, “péptido” se refiere a péptidos de cualquier longitud e incluye a las proteínas. Los términos “polipéptido” y “oligopéptido” se usan en la presente sin ninguna limitación de tamaño pretendida particular, a menos que se describa un tamaño particular.

**[170]** “Administrar” y términos similares se refieren a la introducción física de un agente terapéutico (por ejemplo, polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, vectores para vacunas contra el coronavirus, vacunas contra el coronavirus, polipéptidos mosaico, y composiciones farmacéuticas descritas en la presente) a un sujeto, usando cualquiera de los diferentes métodos y sistemas

de administración conocidos por los expertos en la materia. Las rutas de administración ejemplificativas incluyen una ruta bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas. La administración se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más periodos prolongados.

**[171]** "Tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado, o la administración de un agente activo, a un sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, enlentecer o prevenir el inicio, progresión, desarrollo, severidad o recurrencia de un síntoma, complicación, condición, o indicio bioquímico asociado con una enfermedad.

**[172]** Una "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz", "dosis terapéutica", "dosis eficaz", o "dosificación eficaz", como se usa en la presente, se refieren a una cantidad o a una dosis que logra un objetivo terapéutico, como se describe en la presente. Un experto en la materia comprenderá que una cantidad terapéuticamente eficaz, etc. se puede administrar en una dosis individual, o se puede lograr mediante la administración de dosis múltiples (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis). La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o recurrencia de la enfermedad se puede evaluar usando una variedad de métodos conocidos por el experto en la materia, tal como en sujetos humanos durante

ensayos clínicos, en sistemas de animales modelo predictivos de la eficacia en los humanos, o mediante el ensayo de la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

**[173]** Como se usan en la presente, los términos “prevenir”, “que previene”, “prevención”, “tratamiento profiláctico”, y similares, se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o condición en un sujeto que no posee, pero que presenta un riesgo o es susceptible de desarrollar, una enfermedad o condición.

**[174]** Como se usa en la presente, el término “adyuvante” se refiere a cualquier componente que mejora la respuesta del cuerpo a una vacuna.

**[175]** Como se usa en la presente, el término “vacuna” o “composición de vacuna” se refiere a una composición inmunogénicamente activa para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades. En consecuencia, en algunos aspectos, las vacunas son medicamentos que comprenden o que proveen antígenos y destinados a ser usados en humanos o animales para generar una defensa específica y sustancia protectora mediante vacunación.

**[176]** Tal como se usa en la presente, el término “inducir inmunidad”, “inducir una respuesta inmunológica”, o “inmunogénicamente activo” se refiere a la capacidad de estimular una respuesta inmunológica, es decir, estimular la producción de anticuerpos, particularmente anticuerpos humorales, o de estimular una respuesta mediada por células. Por ejemplo, la capacidad de estimular la producción de anticuerpos circulantes o secretorios o la producción de una respuesta mediada por células en regiones de mucosa local, sangre periférica, fluido espinocefaloal o similares. En algunos aspectos, la cantidad inmunizante eficaz del o de los componentes inmunogénicamente activos de esta divulgación puede variar y puede ser cualquier cantidad suficiente para

provocar una respuesta inmunológica y proveer una respuesta inmunológica protectora contra la infección por coronavirus (por ejemplo, infección por el virus SARS-CoV-2). Se contempla una unidad de dosificación que comprende una composición (por ejemplo, un polinucleótido, construcción de ácido nucleico, polipéptido mosaico, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o composición farmacéutica) de la divulgación. En la presente se contempla por lo menos una unidad de dosificación por paciente como un régimen de vacunación. En algunas formas de realización, pueden ser útiles dos o más unidades de dosificación. El experto reconocerá fácilmente que se puede optimizar una cantidad particular de composición de vacuna por unidad de dosificación, así como también el número total de unidades de dosificación por régimen de vacunación, con la condición de que en última instancia se administre una cantidad inmunizante eficaz del virus o un componente del mismo.

**[177]** Una “respuesta inmunológica” o “respuesta inmune” a una sustancia tal como una composición o vacuna es el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpos contra una composición o vacuna de interés. Habitualmente, una “respuesta inmunológica” incluye a título enunciativo no taxativo, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T colaboradoras y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. En algunos aspectos, el sujeto puede presentar una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de manera que se potencia la resistencia a una nueva infección y/o se reduce la severidad clínica de la enfermedad. En algunos aspectos, dicha protección se puede demostrar por una reducción o falta

de síntomas presentados normalmente por un sujeto infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el sujeto infectado.

**[178]** Se reconoce que los polipéptidos antigénicos de la divulgación pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos activos o variantes de los mismos. En algunos aspectos, el término “fragmentos activos” o “variantes activas” o “fragmentos antigénicos” se refiere a fragmentos o variantes que retienen toda o una parte de la naturaleza antigénica del polipéptido. Por lo tanto, en algunos aspectos, la presente divulgación abarca cualquier proteína de la espícula (S) mosaico de coronavirus, antígeno, epítope o inmunógeno que ejerce, induce o estimula una respuesta inmunogénica en un sujeto.

**[179]** El término “epítope” se refiere al sitio en un antígeno o hapteno contra el cual responden las células B y/o células T específicas. El término también se usa como sinónimo de “determinante antigénico” o “sitio determinante antigénico”. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítope se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

**[180]** Como se usa en la presente, el término “agente farmacéutico”, “composición farmacéutica”, o “fármaco” o cualquier otro término similar se refiere a cualquier material químico o biológico adecuado para la administración mediante los métodos previamente conocidos en el arte y/o mediante los métodos que se divulgan en la presente divulgación, que induce un efecto biológico o farmacológico deseado, que puede incluir a título enunciativo no taxativo (1) tener un efecto profiláctico en el organismo y prevenir un efecto biológico no deseado tal como prevenir una infección, (2) aliviar una condición provocada por una enfermedad, por ejemplo, aliviar el dolor o inflamación

provocada como resultado de una enfermedad, y/o (3) aliviar, reducir, o eliminar por completo una enfermedad del organismo. El efecto puede ser local o puede ser sistémico.

**[181]** Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo que hace adecuada a la composición para el uso farmacéutico" se refiere a un vehículo que se puede administrar a un sujeto, junto con un agente, y el cual no destruye la actividad farmacológica del agente y no es tóxico cuando se administra en una dosis suficiente para proveer una cantidad terapéutica del agente. En ciertos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un solvente acuoso, es decir, un solvente que comprende agua, opcionalmente con cosolventes adicionales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplificativos incluyen agua, soluciones amortiguadoras en agua (tal como solución salina amortiguada con fosfato (PBS), y dextrosa al 5% en agua (D5W). En determinadas formas de realización, el solvente acuoso además comprende dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente entre 1 y 4%, o entre 1 y 3%. En ciertos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es isotónico (es decir, tiene sustancialmente la misma presión osmótica que un fluido corporal tal como el plasma).

**[182]** Un "sujeto" incluye cualquier humano o animal no humano. El término "animal no humano" incluye, a título enunciativo no taxativo, vertebrados tales como primates no humanos, ovejas, perros y roedores tales como ratones, ratas y conejillos de Indias. En algunos aspectos, el sujeto es un humano. Los términos "sujeto" y "paciente" se usan como sinónimos en la presente.

**[183]** El término "expresión" como se usa en la presente se refiere a un proceso por el cual un polinucleótido produce un producto génico, por ejemplo, una

proteína de la espícula (S) mosaico de coronavirus o fragmento antigénico de la misma. En algunos aspectos, incluye, sin limitación, la transcripción del polinucleótido a ARN mensajero (ARNm) y la traducción de un ARNm a un polipéptido. La expresión produce un "producto génico". Como se usa en la presente, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen, o un polipéptido que es traducido desde un transcrita. Los productos génicos descritos en la presente además pueden incluir ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación o corte y empalme, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glicosilación, el agregado de lípidos, asociación con otras subunidades proteicas, o escisión proteolítica. En algunos aspectos, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas que se describen en la presente se expresan en levaduras, tal como en una cepa de *Pichia pastoris*, y se aíslan (por ejemplo, aisladas usando lisis mecánica presurizada).

**[184]** Como se usa en la presente, el término "5'" o "5 prima" se refiere al extremo 5' de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico, y el término "3'" o "3 prima" se refiere al extremo 3' del ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico.

**[185]** Los términos "idéntico", presenta "identidad", o porcentaje de "identidad de secuencia" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácido que iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para un máximo de correspondencia, sin considerar ninguna sustitución conservativa de aminoácido

como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad se puede medir usando programas de computación o algoritmos de comparación de secuencias o mediante una inspección visual. En el arte se conocen varios algoritmos y programas de computación que se pueden usar para obtener los alineamientos de las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos.

**[186]** Como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN con capacidad para controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En algunos aspectos, una secuencia codificante se ubica en dirección 3' desde una secuencia promotora. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Por ejemplo, los promotores adecuados se pueden seleccionar de la Base de datos de Promotores Eucariotas (EPDB). Los expertos en la materia comprenden que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes estadios de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que pueden hacer que un gen se exprese en la mayoría de los tipos celulares en la mayoría de las veces son habitualmente llamados "promotores constitutivos". Los promotores que hacen que un gen se exprese en un tipo celular específico habitualmente son llamados "promotores específicos de célula" o "promotores específicos de tejido". Los promotores que hacen que un gen se exprese en un estadio específico de desarrollo o de diferenciación celular habitualmente son llamados "promotores específicos de desarrollo" o "promotores específicos de diferenciación celular". Los promotores que se inducen y hacen que un gen se exprese luego de la

exposición o tratamiento de la célula con un agente, molécula biológica, químico, ligando, luz, o similar que induce al promotor habitualmente son llamados "promotores inducibles" o "promotores regulables". Además se reconoce que, ya que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido definidos por completo, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad promotora.

**[187]** El término "conectado en forma operativa" se refiere a elementos genéticos que están unidos entre sí de una manera que les permite llevar a cabo sus funciones normales. Por ejemplo, un gen está conectado en forma operativa a un promotor cuando su transcripción está bajo el control del promotor y esta transcripción resulta en la producción del producto codificado por el gen.

**[188]** El término "anticuerpo" incluye moléculas o fragmentos activos (es decir, fragmentos de unión a antígeno) de moléculas que se unen a antígenos. Estos fragmentos activos pueden derivar de un anticuerpo de la presente divulgación mediante diferentes técnicas. Para una descripción adicional de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase por ejemplo, Khaw, B. A. y col. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982). El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos biespecíficos y quiméricos y anticuerpos de especies distintas a los mamíferos.

**[189]** El término "vector", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico con capacidad de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido unido; o una entidad que comprende dicha molécula de ácido nucleico con capacidad de transportar otro ácido nucleico. En algunos aspectos, el vector es un vector no viral (por ejemplo, un plásmido de ADN, un vector bacteriano, un cósmido o un cromosoma artificial). En algunos aspectos, el vector no viral es un

"plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de hebra doble circular en el cual se han ligado segmentos de ADN adicionales. En algunos aspectos, el vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. En algunos aspectos, dichos vectores virales incluyen, a título enunciativo no taxativo: un vector basado en poxvirus (por ejemplo, un vector vacuna o un vector vacuna Ankara modificado (MVA)), un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de baculovirus, un vector de herpesvirus (por ejemplo, un vector de citomegalovirus (CMV)), un vector de virus de simio 40 (SV40), un vector de papilomavirus, un vector de alfavirus, un vector de virus del tumor mamario de ratón, un vector del virus de la leucemia murina de Moloney, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector viral con replicación defectuosa. En algunos aspectos, el vector viral es una partícula similar a virus. Ciertos vectores, o polinucleótidos que son parte de los vectores, tienen la capacidad de replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la cual se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano, y vectores mamíferos episomales). Se pueden integrar otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) al genoma de una célula huésped al introducirlos en la célula huésped, y para de esta manera replicarse junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores tienen la capacidad de dirigir la expresión de genes a los cuales están conectados en forma operativa.

**[190]** Diferentes aspectos de la divulgación se describen, divulgan o ilustran con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

### **5.3 Composiciones y métodos ejemplificativos**

**[191]** La presente divulgación se relaciona con composiciones y métodos que emplean polinucleótidos (por ejemplo, construcciones de ácido nucleico, polinucleótidos aislados y moléculas de ácido nucleico recombinantes), vectores vacuna, proteínas de la espícula (S) mosaico de coronavirus (MoCoV), o fragmentos antigénicos de las mismas (por ejemplo, vectores virales para vacunas, vectores no virales para vacunas, y células huéspedes recombinantes que codifican o expresan una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, o extractos de células huéspedes recombinantes). En algunos aspectos, la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma se obtiene de una célula huésped recombinante tal como una célula procariota recombinante, una célula eucariota recombinante o una línea celular eucariota.

**[192]** En algunos aspectos, las composiciones y métodos de la presente divulgación son útiles para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus. En algunos aspectos, las composiciones y métodos de la presente divulgación son útiles para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite. Las composiciones de la presente divulgación, por ejemplo una dosis individual de las mismas, son inmunoterapéuticos de amplio espectro y proveen actividad profiláctica y/o terapéutica contra una variedad de cepas de coronavirus.

**[193]** En algunos aspectos, las composiciones de la presente divulgación además comprenden un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, las composiciones se administran de forma oral, por ejemplo, en una formulación adecuada para administrar una o más proteínas. En algunos

aspectos, las composiciones se administran mediante otras rutas de administración aceptables diferentes, por ejemplo, mediante inyección parenteral, por vía intranasal, o mediante una inyección intramuscular. En algunos aspectos, las composiciones se administran al sujeto una o más veces, en momentos que incluyen, pero no se limitan a entre 1 y 7 días, entre 1 y 3 semanas, o aproximadamente 1, 2, 3, 4 o más meses (por ejemplo, hasta aproximadamente 6 meses) antes de que el sujeto se exponga a un coronavirus. En algunos aspectos, las composiciones se administran al sujeto una o más veces después de la exposición a un coronavirus, por ejemplo, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 4 días o más (por ejemplo, hasta aproximadamente 2 semanas) después de la exposición.

#### **5.3.1 Polinucleótidos y Construcciones de Ácido Nucleico**

**[194]** Los polinucleótidos de la presente divulgación (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) pueden incluir secuencias de ADN y/o ARN para usar en las composiciones farmacéuticas y las vacunas que se describen o ejemplifican en la presente.

**[195]** La presente divulgación también provee construcciones de ácido nucleico (por ejemplo, polinucleótidos aislados o moléculas de ácido nucleico recombinantes) que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas descritas o ejemplificadas en la presente que son inmunogénicas para los antígenos derivados de dos o más cepas distintas de coronavirus (por ejemplo, proveen protección contra dos o más cepas distintas de coronavirus).

**[196]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ADN. En algunos aspectos, el polinucleótido de ADN es un

polinucleótido de ADN de hebra simple (ADNhs). En algunos aspectos, el polinucleótido de ADN es un polinucleótido de ADN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ARN. En algunos aspectos, el polinucleótido de ARN es un polinucleótido de ARN de hebra simple (ARNhs). En algunos aspectos, el polinucleótido de ARN es un ARN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un polinucleótido de ADN y ARN de hebra doble. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico es un ARNm. En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5'. En algunos aspectos, el ARNm comprende una 5'-UTR. En algunos aspectos, el ARNm comprende una 3'-UTR. En algunos aspectos, el ARNm comprende una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5' y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 5'-UTR, y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 3'-UTR, y una poli(A). En algunos aspectos, el ARNm comprende una protección en el extremo 5', una 5'-UTR, una 3'-UTR, y una poli(A).

**[197]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína de la espícula (S) mosaico de coronavirus (MoCoV) o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S o un

fragmento antigénico de la misma y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera y la segunda proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera, la segunda y la tercera proteína MoCoV S o los fragmentos antigénicos de las mismas están optimizados para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano.

**[198]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos un (por ejemplo, por lo menos uno, por

lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago.

**[199]** En algunos aspectos, los coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, los coronavirus de murciélago se seleccionan del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos.

**[200]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[201]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende uno o más promotores. En algunos aspectos, el promotor es un promotor inducible. En algunos aspectos, el promotor es un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el uno o más promotores se seleccionan del

grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos.

**[202]** En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor, un segundo promotor, un tercer promotor, o cualquier combinación de los mismos, en donde el primer promotor, el segundo promotor, y el tercer promotor tienen la capacidad de controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, respectivamente. En algunos aspectos, el primer promotor, el segundo promotor, y el tercer promotor están conectados en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y la tercera secuencia de ácido nucleico, respectivamente. En algunos aspectos, el primer promotor, el segundo promotor, y el tercer promotor se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8), o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[203]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende una primera secuencia de terminación de la transcripción, una segunda secuencia de terminación de la transcripción, una tercera secuencia de terminación de la transcripción, o cualquier combinación de las mismas, en donde la primera secuencia de terminación de la transcripción, la segunda secuencia de terminación de la transcripción, y la tercera secuencia de terminación de la transcripción están conectadas en forma operativa a la primera

secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y la tercera secuencia de ácido nucleico, respectivamente.

**[204]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[205]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y/o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1.

**[206]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de M1), SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de M2), SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de M3), SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de M4), SEQ ID NO: 11 (secuencia de aminoácidos de MB), SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos de M5), SEQ ID NO: 15 (secuencia de aminoácidos de M5 + D510G), SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos de M5 + I529T), o SEQ ID NO: 17 (secuencia de aminoácidos de M5 + D510G + I529T). En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 (secuencia de ácido nucleico de M1), SEQ ID NO: 4 (secuencia de ácido nucleico de M2), SEQ ID NO: 6 (secuencia de ácido nucleico de M3), SEQ ID NO: 10 (secuencia de ácido nucleico de M4), SEQ ID NO: 12 (secuencia de ácido nucleico de MB), SEQ ID NO: 14 (secuencia de ácido nucleico de M5), o un complemento de las mismas. En algunos aspectos, la

primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas.

**[207]** En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas. En algunos aspectos, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas.

**[208]** En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por

lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas. En algunos aspectos, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o un complemento de las mismas.

**[209]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:

15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[210]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%,

por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14.

**[211]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por

lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[212]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la

secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[213]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos

99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12.

**[214]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[215]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[216]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por

lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de

la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14.

**[217]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, la segunda

secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14.

**[218]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la tercera secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14.

**[219]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma

operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un primer promotor, una segunda secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un segundo promotor, y una tercera secuencia de ácido nucleico conectada en forma operativa con un tercer promotor, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico

de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primero, el segundo y el tercero de los promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[220]** En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera proteína MoCoV S, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda proteína MoCoV S, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una tercera proteína MoCoV S, en donde la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, en donde la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y en donde la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende un primer promotor con capacidad para controlar la expresión de la primera proteína MoCoV S, un segundo promotor con capacidad para controlar la expresión de la segunda proteína MoCoV S, y un tercer promotor con capacidad para controlar

la expresión de la tercera proteína MoCoV S. En algunos aspectos, el primero, el segundo y el tercero de los promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[221]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico tienen los codones optimizados. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico tienen un número reducido de estructuras secundarias de ARN en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico tienen un número reducido de secuencias de desestabilización de ARN en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada. En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico tienen un número reducido o no tienen secuencias de terminación de la transcripción en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada.

**[222]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico están optimizadas para la expresión en por lo menos un huésped seleccionado. Las secuencias optimizadas incluyen secuencias que tienen los codones

optimizados, es decir, codones que se emplean con mayor frecuencia en un organismo en relación con otro organismo, por ejemplo, un organismo relacionado de manera distante, o un equilibrio en el uso de codones de manera que el codón usado con mayor frecuencia no se use hasta su agotamiento. Otras modificaciones pueden incluir el agregado o la modificación de las secuencias de Kozak y/o intrones, y/o la eliminación de secuencias no deseadas, por ejemplo, potenciales sitios de unión de factores de transcripción.

**[223]** En algunos aspectos, la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico están optimizadas para la expresión en una célula huésped de mamífero. En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico optimizada no hibridiza más con una secuencia no optimizada de manera correspondiente (por ejemplo, de tipo salvaje), por ejemplo, no hibridiza con la secuencia no optimizada en condiciones medias o altas de rigurosidad. El término "rigurosidad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica, y presencia de otros compuestos, en las cuales se llevan a cabo las hibridizaciones de ácido nucleico. Con las condiciones de "alta rigurosidad", el apareamiento de bases de los ácidos nucleicos se producirá solo entre los fragmentos de ácido nucleico que tengan una alta frecuencia de secuencias de bases complementarias. Por lo tanto, con frecuencia se requieren condiciones de "media" o "baja" rigurosidad cuando se desea que se hibridicen o se apareen ácidos nucleicos que no son complementarios por completo entre sí. Se pueden emplear diferentes condiciones equivalentes conocidas en el arte que comprenden condiciones medias o bajas de rigurosidad. Las "condiciones de rigurosidad alta" ejemplificativas, cuando se usan en referencia a la hibridización de ácidos

nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridización a 42° C en una solución que comprende 5x SSPE (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5% de SDS, 5x de reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguido por lavado en una solución que comprende 0,1x de SSPE, 1,0% de SDS a 42° C, cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Las "condiciones de rigurosidad media" ejemplificativas, cuando se usan en referencia a la hibridización de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridización a 42° C en una solución que consiste en 5x de SSPE (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5% de SDS, 5x de reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido por lavado en una solución que comprende 1,0x de SSPE, 1,0% de SDS a 42° C, cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

**[224]** En algunos aspectos, las secuencias de ácido nucleico optimizadas tienen menos de 90% (por ejemplo, menos de 80%) de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia no optimizada correspondiente (por ejemplo, de tipo salvaje). También se proveen vectores para vacunas contra el coronavirus que comprenden secuencias de ácido nucleico optimizadas.

**[225]** En algunos aspectos, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma se optimiza mediante el reemplazo de codones, por ejemplo, por lo menos el 25% de los codones, en una secuencia no optimizada (por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje) con codones que se emplean preferiblemente en una célula particular

(seleccionada). Los codones preferidos tienen una frecuencia relativamente alta de uso de codones en una célula seleccionada, y su introducción resulta en la introducción de relativamente pocos atributos estructurales no deseados. Por lo tanto, el producto de ácido nucleico optimizado puede tener un nivel importante de expresión debido a la frecuencia mejorada en el uso de codones, y un número reducido de secuencias reguladoras de la transcripción no deseadas.

**[226]** Una secuencia de ácido nucleico optimizada puede tener una composición de codones que difiere de la composición de la secuencia de ácido nucleico no optimizada correspondiente (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje) en más del 30%, 35%, 40% o más del 45% (por ejemplo, 50%, 55%, 60% o más) de los codones. Los codones ejemplificativos para usar en la divulgación son aquellos que se emplean con mayor frecuencia en comparación con por lo menos otro codón para el mismo aminoácido en un organismo particular y, en algunos aspectos, también son codones que no tienen un uso bajo en ese organismo y son codones que no tienen un uso bajo en el organismo usado para clonar o cribar de acuerdo con la expresión de la molécula de ácido nucleico. Además, los codones para ciertos aminoácidos (es decir, aquellos aminoácidos que tienen tres o más codones), pueden incluir dos o más codones que se emplean con mayor frecuencia que el otro o los otros codones (no preferidos). La presencia en la molécula de ácido nucleico de codones que se emplean con mayor frecuencia en un organismo que en otro organismo resulta en una molécula de ácido nucleico que, cuando se introduce en las células del organismo que emplea esos codones con mayor frecuencia, se expresa en esas células en un nivel que es mayor que la expresión de la secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje o parental en esas células.

[227] En algunos aspectos, los codones que son diferentes son aquellos que se emplean con mayor frecuencia en un mamífero. Los codones para diferentes organismos son conocidos en el arte, por ejemplo, véase [www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/). Un tipo particular de mamífero, por ejemplo, un humano, puede tener un conjunto diferente de codones empleados con mayor frecuencia en comparación con otro tipo de mamífero. En un aspecto, por lo menos una gran parte de los codones son codones empleados en mamíferos (por ejemplo, humanos). Por ejemplo, los codones empleados con mayor frecuencia en humanos incluyen, a título enunciativo no taxativo, CGC (Arg), CTG (Leu), TCT (Ser), AGC (Ser), ACC (Thr), CCA (Pro), CCT (Pro), GCC (Ala), GGC (Gly), GTG (Val), ATC (Ile), ATT (Ile), AAG (Lys), AAC (Asn), CAG (Gln), CAC (His), GAG (Glu), GAC (Asp), TAC (Tyr), TGC (Cys) y TTC (Phe). Por lo tanto, en algunos aspectos, las construcciones de ácido nucleico de la divulgación tienen una composición de codones en la cual por lo menos la mayoría de los codones son codones que se emplean con frecuencia en humanos, por ejemplo, CGC, CTG, TCT, AGC, ACC, CCA, CCT, GCC, GGC, GTG, ATC, ATT, AAG, AAC, CAG, CAC, GAG, GAC, TAC, TGC, TTC, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, las construcciones de ácido nucleico de la divulgación pueden comprender los codones que codifican para leucina CTG o TTG, los codones que codifican para valina GTG o GTC, los codones que codifican para glicina GGC o GGT, los codones que codifican para isoleucina ATC o ATT, los codones que codifican para prolina CCA o CCT, los codones que codifican para arginina CGC o CGT, los codones que codifican para serina AGC o TCT, los codones que codifican para treonina ACC o ACT, los codones que codifican para alanina GCC o GCT, o cualquier combinación de los

mismos. Véanse las Figuras 7A-7C para las tablas de uso de codones de tres organismos ejemplificativos diferentes.

**[228]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente además pueden comprender uno o más elementos reguladores de postranscripcionales. En algunos aspectos, el elemento regulador postraducciona se posiciona 3' a la región codificante del polinucleótido. Los ejemplos no limitantes de elementos reguladores postranscripcionales que son útiles para la presente divulgación incluyen un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE), un elemento regulador postranscripcional del virus de la Hepatitis B (HPRE), secuencias señal de poliadenilación, señales de unión/corte y empalme de intrones/exones, elementos sintéticos, o cualquier combinación de los mismos.

**[229]** Las construcciones de ácido nucleico también pueden comprender una o más señales de poliadenilación (poli(A)), que pueden estar corriente abajo de cualquier secuencia codificante de una proteína. Los ejemplos de señales de poliadenilación incluyen a título enunciativo no taxativo una cola poli(A) de SV40, una cola poli(A) de LTR, una cola poli(A) de hormona de crecimiento bovina (bGH), una cola poli(A) de hormona de crecimiento humana (hGH), o una cola poli(A) de  $\beta$ -globina humana. En algunos aspectos, las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente comprenden además por lo menos una secuencia de cola poli(A) UTR 3' conectada en forma operativa a la primera secuencia de ácido nucleico, la segunda secuencia de ácido nucleico, la tercera secuencia de ácido nucleico, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, la secuencia de cola poli(A) UTR 3' es una secuencia de cola poli(A) UTR 3' de SV40, una secuencia de cola poli(A) UTR 3' de hormona

de crecimiento bovina (bGH), una secuencia de cola poli(A) UTR 3' de actina, una secuencia de cola poli(A) UTR 3' de hemoglobina, o cualquier combinación de las mismas.

**[230]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente pueden comprender además por lo menos una secuencia potenciadora corriente arriba de cualquier secuencia codificante de proteína. En algunos aspectos, la secuencia potenciadora es una secuencia potenciadora viral. En algunos aspectos, la secuencia potenciadora es una secuencia potenciadora no viral. Los ejemplos de secuencias potenciadoras virales y no virales incluyen, a título enunciativo no taxativo, una secuencia potenciadora de SV40, una secuencia potenciadora del virus de polio, una secuencia potenciadora de citomegalovirus, una secuencia potenciadora de VIH, una secuencia potenciadora de inmunoglobulina, una secuencia potenciadora de interferón, una secuencia potenciadora de quimiotripsina, una secuencia potenciadora de insulina, una secuencia potenciadora de metalotioneína, una secuencia potenciadora de beta-actina y una secuencia potenciadora sintética.

**[231]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente pueden comprender además una o más repeticiones terminales invertidas (ITR). En algunos aspectos, las construcciones de ácido nucleico comprenden una primera ITR y una segunda ITR. En algunos aspectos, las construcciones de ácido nucleico comprenden una primera ITR, por ejemplo, una ITR 5', y una segunda ITR, por ejemplo, una ITR 3'. Típicamente, las ITR están involucradas en la replicación y el rescate del ADN de parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados (AAV)), o la escisión de plásmidos procariotas. Además, las ITR parecen ser las secuencias mínimas requeridas para la integración

proviral del AAV y para el empaquetamiento del ADN del AAV en los viriones. Estos elementos son esenciales para la multiplicación eficaz de un genoma de parvovirus. En algunos aspectos, las ITR se pliegan en una estructura con forma de horquilla en T. En algunos aspectos, las ITR se pliegan en estructuras de horquilla sin forma de T, por ejemplo, en una estructura en horquilla con forma de U.

**[232]** En algunos aspectos, las ITR que son útiles para la presente divulgación comprenden una ITR de un genoma de AAV. En determinados aspectos, la ITR es una ITR de un genoma de AAV que se selecciona entre AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la ITR es una secuencia sintética modificada genéticamente para incluir en sus extremos 5' y 3' terminales las ITR derivadas de uno o más genomas de AAV.

**[233]** En algunos aspectos, la ITR no deriva de un genoma de AAV. En algunos aspectos, la ITR es una ITR que no es de AAV. En algunos aspectos, la ITR es una ITR de un genoma distinto a AAV de la familia viral *Parvoviridae* que se selecciona, a título enunciativo no taxativo, del grupo que consiste en *Bocavirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus*, *Parvovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, *Contravirus*, *Aveparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Penstyldensovirus* y cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, la ITR deriva del eritrovirus parvovirus B19 (virus de humano). En algunos aspectos, la ITR deriva de una cepa de parvovirus de pato Muscovy (MDPV). En ciertos aspectos, la cepa de MDPV está atenuada, por ejemplo, la cepa FZ91-30 de MDPV. En algunos aspectos, la cepa MDPV es patogénica, por ejemplo, la cepa YY de

MDPV. En algunos aspectos, la ITR deriva de un parvovirus de porcino, por ejemplo, el parvovirus U44978 de porcino. En algunos aspectos, la ITR deriva de un virus diminuto de ratón, por ejemplo, el virus diminuto de ratón U34256. En algunos aspectos, la ITR deriva de un parvovirus canino, por ejemplo, el parvovirus canino M19296. En algunos aspectos, la ITR deriva de un virus de enteritis de visón, por ejemplo, el virus de enteritis de visón D00765. En algunos aspectos, la ITR deriva de un *Dependoparvovirus*. En ciertos aspectos, el *Dependoparvovirus* es una cepa de parvovirus de ganso *Dependovirus* (GPV). En algunos aspectos, la cepa de GPV está atenuada, por ejemplo, la cepa 82-0321V de GPV. En algunos aspectos, la cepa de GPV es patogénica, por ejemplo, la cepa GPV.

**[234]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente pueden comprender también un origen de replicación de mamífero (por ejemplo, un origen de replicación del virus de Epstein Barr) con el objetivo de mantener la construcción de ácido nucleico de manera extracromosómica y producir múltiples copias de la construcción de ácido nucleico en una célula.

**[235]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente se pueden emplear solas o con uno o más agentes inmunógenos en una vacuna, tales como otros virus, para generar un antisuero específico contra el virus, para terapia génica, y/o para diagnóstico.

**[236]** Las construcciones de ácido nucleico que se describen o ejemplifican en la presente se pueden emplear en un vector para expresar una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, por ejemplo, para la elaboración de una vacuna de proteína recombinante o para generar un antisuero, como una vacuna de ácido nucleico, para usar en diagnóstico, para la

elaboración de ARN viral (ARNv), para preparar genes quiméricos, por ejemplo, con otros genes virales que incluyen otros coronavirus, y/o para preparar virus recombinantes.

### **5.3.2 Vectores para Vacunas Contra el Coronavirus**

**[237]** La presente divulgación también provee vectores para vacunas contra el coronavirus que comprenden cualquier construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido aislado o una molécula de ácido nucleico recombinante) descrita o ejemplificada en la presente.

**[238]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus comprende un primer polinucleótido que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus comprende un primer polinucleótido que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y un segundo polinucleótido que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus comprende un primer polinucleótido que codifica para una primera proteína MoCoV S o un fragmento

antigénico de la misma, un segundo polinucleótido que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, y un tercer polinucleótido que codifica para una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano.

**[239]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago.

**[240]** En algunos aspectos, los coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, los coronavirus de murciélago se seleccionan del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos.

**[241]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[242]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus además comprende uno o más promotores. En algunos aspectos, el promotor es un promotor inducible. En algunos aspectos, el promotor es un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el uno o más promotores se seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8) y cualquier combinación de los mismos.

**[243]** En algunos aspectos, el uno o más promotores comprenden un primer promotor, un segundo promotor, un tercer promotor, o cualquier combinación de los mismos, en donde el primer promotor, el segundo promotor, y el tercer promotor están conectados en forma operativa con el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y el tercer polinucleótido, respectivamente. En algunos aspectos, el primer promotor, el segundo promotor, y el tercer promotor se

seleccionan del grupo que consiste en: un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8), o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, el primer promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), el segundo promotor es un promotor de E/L de S (SEQ ID NO: 7), y el tercer promotor es un promotor de LEO (SEQ ID NO: 8).

**[244]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y/o el tercer polinucleótido incluyen una secuencia de ácido nucleico para la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma que posee los codones optimizados. En algunos aspectos, el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y/o el tercer polinucleótido incluyen una secuencia de ácido nucleico para la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma que tiene un número reducido de estructuras secundarias de ARN en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada. En algunos aspectos, el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y/o el tercer polinucleótido incluyen una secuencia de ácido nucleico para la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma que tiene un número reducido de secuencias de desestabilización de ARN en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada. En algunos aspectos, el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y/o el tercer polinucleótido incluyen una secuencia de ácido nucleico para la proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma que tiene un número reducido de o ninguna secuencia de terminación de la transcripción en relación con una secuencia de ácido nucleico no modificada.

**[245]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus además comprende una primera secuencia de terminación de la transcripción, una segunda secuencia de terminación de la transcripción, una tercera

secuencia de terminación de la transcripción, o cualquier combinación de las mismas, en donde la primera secuencia de terminación de la transcripción, la segunda secuencia de terminación de la transcripción, y la tercera secuencia de terminación de la transcripción están conectadas en forma operativa con el primer polinucleótido, el segundo polinucleótido, y el tercer polinucleótido, respectivamente.

**[246]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[247]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y/o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una

protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1.

**[248]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: (1) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; (2) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; (3) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, (4) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, (6) una secuencia de

aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, (7) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, (8) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, (9) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, y (10) cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en: (1) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; (2) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; (3) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (4) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (5) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; (6) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (7) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (8) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; (9) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; y (10) cualquier combinación de las mismas.

**[249]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[250]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[251]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[252]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por

lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[253]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11.

**[254]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[255]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[256]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por

lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[257]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de

la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[258]** En algunos aspectos, el segundo polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[259]** En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% (por ejemplo, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[260]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 14, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12.

**[261]** En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, el segundo polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 10, el segundo

polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12, y el tercer polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 14.

**[262]** En algunos aspectos, el vector para vacunas contra el coronavirus es un vector viral, un vector no viral, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector basado en poxvirus (por ejemplo, un vector vacuna o un vector vacuna Ankara modificado (MVA)), un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de baculovirus, un vector de herpesvirus (por ejemplo, un vector de citomegalovirus (CMV)), un vector de virus de simio 40 (SV40), un vector de papilomavirus, un vector de alfavirus, un vector de virus del tumor mamario de ratón, un vector del virus de la leucemia murina de Moloney, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el vector viral es un vector viral con replicación defectuosa. En algunos aspectos, el vector viral es un vector basado en poxvirus. En algunos aspectos, el vector basado en poxvirus es un vector basado en virus vacuna. En algunos aspectos, el vector basado en virus vacuna es un vector basado en virus vacuna Ankara modificado (MVA). En algunos aspectos, el vector viral es una partícula similar a virus. En algunos aspectos, el vector no viral es un plásmido de ADN, un cósmido, un vector bacteriano, un cromosoma artificial, o cualquier combinación de los mismos.

**[263]** En algunos aspectos, el vector viral o el vector no viral presenta una propiedad adyuvante. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, en algunos aspectos, la propiedad adyuvante del vector viral o del vector no viral promueve la movilización de las células presentadoras de antígeno al sitio de la administración de la vacuna y expresión del antígeno, aumentando así la

captación del polinucleótido y los antígenos expresados por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales para inducir la presentación en las MHC de Clase I y las MHC de Clase II.

### **5.3.3 Vacunas contra el Coronavirus**

**[264]** La presente divulgación también provee vacunas contra el coronavirus que comprenden cualquier proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma descrito o ejemplificado en la presente, y uno o más vehículos.

**[265]** En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus comprende una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y uno o más vehículos, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma está optimizado para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus comprende una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma y un segundo polinucleótido que codifica para una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma y la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano. En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus comprende una primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, una segunda proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, y una tercera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma, en donde la primera proteína MoCoV S o el

fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano.

**[266]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de por lo menos dos (por ejemplo, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de humano y por lo menos uno (por ejemplo, por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco) coronavirus de murciélago.

**[267]** En algunos aspectos, los coronavirus de humano se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63 y cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, los coronavirus de murciélago se seleccionan del grupo que consiste en: BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279 y cualquier combinación de los mismos.

**[268]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV,

SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o cualquier combinación de las mismas, están optimizadas para una cobertura máxima de epitopes para células T de HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279.

**[269]** En algunos aspectos, el fragmento antigénico de la primera proteína MoCoV S, la segunda proteína MoCoV S y/o la tercera proteína MoCoV S comprenden por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 45, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 750, por lo menos 1.000, o por lo menos 1.250 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[270]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, y/o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17 con una o más inserciones,

sustituciones y/o eliminaciones de aminoácido, siempre y cuando la secuencia resultante tenga inmunogenicidad en un sujeto, por ejemplo, proporcionando una protección contra dos o más especies distintas de coronavirus. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, la segunda proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma, o la tercera proteína MoCoV S o el fragmento antigénico de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más de las sustituciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1.

**[271]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[272]** En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[273]** En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% (por ejemplo, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[274]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera

proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[275]** En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, la primera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la segunda proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y la tercera proteína MoCoV S comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

**[276]** En algunos aspectos, el vehículo es un virus (por ejemplo, un virus recombinante). En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna (por ejemplo, un poxvirus tal como MVA), un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un alfavirus, un lentivirus, un retrovirus, un baculovirus, un herpesvirus, un papilomavirus, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el

vehículo es un poxvirus. En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna. En algunos aspectos, el vehículo es un virus vacuna Ankara modificado (MVA). En algunos aspectos, el vehículo es una partícula similar a virus. En algunos aspectos, el vehículo es un vehículo no viral. En algunos aspectos, el vehículo comprende dos o más tipos diferentes de virus y/o partículas similares a virus. En algunos aspectos, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, adecuado para una ruta bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas).

**[277]** En algunos aspectos, el vehículo presenta una propiedad adyuvante. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, en algunos aspectos, la propiedad adyuvante del componente de administración promueve la movilización de las células presentadoras de antígeno al sitio de la administración de la vacuna y expresión del antígeno, aumentando así la captación del polinucleótido y los antígenos expresados por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales para inducir la presentación en las MHC de Clase I y las MHC de Clase II.

**[278]** En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus que se describe en la presente es una vacuna de ARNm. En algunos aspectos, la vacuna de ARNm comprende un ARN de hebra simple que puede ser traducido a la respectiva proteína al entrar a las células de un receptor. Además de las secuencias de tipo salvaje o con los codones optimizados que codifican para la secuencia del

antígeno, el ARN puede contener uno o más elementos estructurales para la máxima eficacia del ARN respecto a la estabilidad y eficacia de traducción (protección en el extremo 5', 5' UTR, UTR 3', cola poli(A)). En una forma de realización, el ARN contiene todos estos elementos. En algunos aspectos, el ARN comprende una modificación química.

**[279]** Además, se puede fusionar un péptido señal de secreción a las regiones que codifican para el antígeno, preferiblemente de manera que el péptido señal de secreción sea traducido como una marca en el extremo N terminal. En una forma de realización, el péptido señal de secreción corresponde al péptido señal de secreción de la proteína S. Las secuencias que codifican para péptidos conectores cortos predominantemente consisten en los aminoácidos glicina (G) y serina (S), tal como se usan habitualmente para las proteínas de fusión se pueden usar como conectores GS.

**[280]** Se puede hacer que la vacuna de ARNm forme complejos con proteínas y/o lípidos, preferiblemente lípidos, para generar partículas de ARN para la administración. Si se usa una combinación de diferentes ARN, los ARN pueden formar complejos entre sí o pueden formar complejos por separado con proteínas y/o lípidos para generar partículas de ARN para la administración.

**[281]** En algunos aspectos, la vacuna de ARNm se administra en la forma de una nanopartícula lipídica. La nanopartícula lipídica puede comprender cualquier lípido con capacidad de formar una partícula a la cual se unen una o más moléculas de ácido nucleico, o en la cual se encapsulan una o más moléculas de ácido nucleico.

**[282]** En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica comprende uno o más lípidos catiónicos, y uno o más lípidos estabilizantes. En algunos aspectos, la

nanopartícula lipídica comprende un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico, un esteroide, un lípido catiónico ionizable, o cualquier combinación de los mismos.

**[283]** En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroide, un lípido conjugado con polímero; y el ARN, encapsulado dentro de la nanopartícula lipídica o asociado con ella.

**[284]** En algunos aspectos, la vacuna de ARNm comprende un ARNm que codifica para la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o combinaciones de las mismas. En algunos aspectos, la vacuna de ARNm comprende un ARNm que corresponde a la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, o combinaciones de las mismas.

**[285]** En algunos aspectos, en la presente se provee una composición que comprende una nanopartícula lipídica y un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que comprende una primera secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la primera secuencia nucleotídica codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13.

**[286]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 272 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[287]** En algunos aspectos, el ORF del párrafo 272 además comprende una segunda secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la segunda secuencia nucleotídica codifica para un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda secuencia polinucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[288]** En algunos aspectos, el ORF del párrafo 272 además comprende una tercera secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14; en donde la tercera secuencia nucleotídica codifica para un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la tercera secuencia polinucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, o SEQ ID NO: 14.

**[289]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 272 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 12 y codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

**[290]** En algunos aspectos, la primera secuencia nucleotídica del párrafo 272 comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 12 y codifica para un primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; en donde la segunda secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 4 y codifica para un segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y en donde la tercera secuencia nucleotídica comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 6 y codifica para un tercer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

**[291]** En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica del párrafo 272 comprende un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico, un estero, un lípido catiónico ionizable, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el ARNm comprende una región no traducida (UTR) en el extremo 5' y una UTR 3'. En algunos aspectos, el ARNm comprende una modificación química.

**[292]** Los lípidos y nanopartículas lipídicas que comprenden ácidos nucleicos y su método de preparación se divulgan en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.569.256, Patente de los EE.UU. No. 5.965.542 y Publicaciones de Patente de los EE.UU. Nos. 2016/0199485, 2016/0009637, 2015/0273068, 2015/0265708, 2015/0203446, 2015/0005363, 2014/0308304, 2014/0200257, 2013/0338210, 2013/0323269, 2013/0245107, 2013/0195920, 2013/0123338,

2013/0022649, 2013/0017223, 2012/0295832, 2012/0183581, 2012/0172411, 2012/0027803, 2012/0058188, 2011/0311583, 2011/0311582, 2011/0262527, 2011/0216622, 2011/0117125, 2011/0091525, 2011/0076335, 2011/0060032, 2010/0130588, 2007/0042031, 2006/0240093, 2006/0083780, 2006/0008910, 2005/0175682, 2005/0118253, 2005/0064595, 2004/0142025, 2007/0042031, y Pub. PCT Nos. WO 99/39741, WO 2018/081480, WO 2018/078053, WO 2017/004143, WO 2017/075531, WO 2015/199952, WO 2014/008334, WO 2013/086373, WO 2013/086322, WO 2013/016058, WO 2013/086373, WO 2011/141705, y WO 1999/009076, cuyas divulgaciones completas se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad para todos los propósitos.

**[293]** En el arte se describen otros lípidos y nanopartículas lipídicas ejemplificativas y su elaboración, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. U.S. 2012/0276209, Semple y col., 2010, Nat Biotechnol., 28(2):172-176; Akinc y col., 2010, Mol Ther., 18(7): 1357-1364; Basha y col., 2011, Mol Ther, 19(12): 2186-2200; Leung y col., 2012, J Phys Chem C Nanomater Interfaces, 116(34): 18440-18450; Lee y col., 2012, Int J Cancer., 131(5): E781-90; Belliveau y col., 2012, Mol Ther Nucleic Acids, 1: e37; Jayaraman y col., 2012, Angew Chem Int Ed Engl., 51(34): 8529-8533; Mui y col., 2013, Mol Ther Nucleic Acids, 2, e139; Maier y col., 2013, Mol Ther., 21(8): 1570-1578; y Tam y col., 2013, Nanomedicine, 9(5): 665-74, en donde cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a modo de referencia. Los lípidos y su elaboración se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicaciones de los EE.UU. Nos. 2015/0376115 y 2016/0376224, las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia.

[294] En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus comprende una o más proteínas MoCoV S aisladas o fragmentos antigénicos de las mismas en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunológica anti-coronavirus en un sujeto. Por ejemplo, la proteína recombinante (por ejemplo, una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma) se puede aislar de un sistema de expresión adecuado, tal como bacterias, células de insecto o levaduras, por ejemplo, *E. coli*, *L. lactis*, *Pichia* o *S. cerevisiae* u otros sistemas de expresión en bacterias, insectos o levaduras, o sistemas de expresión en mamíferos tal como T-REx™ (Invitrogen). Por ejemplo, para preparar proteínas recombinantes aisladas, se puede emplear cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo, *E. coli* o levaduras, o células huéspedes infectadas, para expresar esas proteínas. Esos sistemas de expresión celular también se pueden emplear como sistemas de administración, por ejemplo, cuando la proteína es una que se expresa sobre la superficie de la célula o de una manera secretada. Un sistema de administración celular adecuado puede ser uno para la administración oral. Una proteína recombinante útil en las composiciones y métodos de la invención se puede expresar en la superficie de una célula procariota o eucariota, o puede ser secretada por esa célula, y se puede expresar como una fusión o puede unirse a una molécula que altera la solubilidad (por ejemplo, previene la agregación) o la vida media de la molécula quimérica resultante, por ejemplo, una molécula tratada con PEG. En un aspecto, la vacuna contra el coronavirus puede comprender una célula recombinante que expresa una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, por ejemplo, en la superficie de la célula o como una proteína secretada.

[295] En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus se encuentra en forma seca por congelación.

[296] En algunos aspectos, la vacuna contra el coronavirus además comprende un adyuvante.

#### **5.3.4 Formulaciones farmacéuticas**

[297] Las composiciones (por ejemplo, polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, vectores para vacunas contra el coronavirus, vacunas contra el coronavirus, o proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas) que se describen o ejemplifican en la presente se pueden formular con vehículos y excipientes convencionales, los cuales se seleccionan de acuerdo con la práctica habitual. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril, y cuando se pretenden para la administración por cualquier otra vía diferente de la administración oral, en general serán isotónicas. Todas las formulaciones contendrán de manera opcional excipientes tales como aquellos que se describen en *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sheskey, P.J. y col., eds., 9<sup>na</sup> Ed., American Pharmacists Association, Washington, DC, y Pharmaceutical Press, Grayslake, IL (2020). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA, hidratos de carbono tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares. El pH de las formulaciones varía en un rango entre aproximadamente 3 y aproximadamente 11, pero habitualmente entre aproximadamente 7 y 10 o entre aproximadamente 8 y 9, por ejemplo, para el poxvirus.

[298] Si bien es posible que los ingrediente activos se administren solos, estos pueden estar presentes como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, para uso veterinario y humano de la divulgación comprenden por lo menos un

ingrediente activo, junto con uno o más vehículos aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las rutas de administración precedentes. Las formulaciones se pueden presentar de manera conveniente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte de la farmacia. Las técnicas y las formulaciones en general se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18va Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). Dichos métodos incluyen el paso de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general las formulaciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima del ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, se le otorga forma al producto.

**[299]** Las formulaciones de la divulgación adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos en donde cada uno contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

**[300]** Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden incluir uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las formulaciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración pretendido. Cuando se utilizan para el uso oral, se pueden preparar por ejemplo comprimidos, pastillas, pastillas romboidales,

suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones pretendidas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en el arte de la elaboración de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el objetivo de proveer una preparación agradable al paladar.

**[301]** Las formulaciones para uso oral también se pueden preparar como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, tal como aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

**[302]** Las suspensiones acuosas de la invención contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato

de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

**[303]** Las suspensiones oleosas también se pueden formular mediante la suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal, tal como aceite de Arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones orales pueden contener un agente espesante, tal como cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como aquellos descritos precedentemente, y los agentes saborizantes se pueden agregar para proveer una preparación oral agradable para el paladar. Estas composiciones se pueden conservar mediante el agregado de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

**[304]** La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación en el tiempo pensada para administración oral para humanos puede contener aproximadamente entre 1 y 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material vehículo el cual puede variar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 95% de la composición total (peso : peso). La composición farmacéutica se puede preparar para proveer cantidades que se puedan medir fácilmente para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa pensada para infusión intravenosa puede contener entre aproximadamente 3 y 500 µg del ingrediente activo por mililitro de solución con el objetivo de permitir la infusión de un volumen adecuado a una tasa de aproximadamente 30 mL/hora.

**[305]** Las formulaciones adecuadas para la administración intrapulmonar o nasal pueden tener un tamaño de partícula, por ejemplo, en el rango entre 0,1 y 500 micrones (incluyendo un tamaño de partícula en un rango entre 0,1 y 500 micrones en incrementos de micrones tales como 0,5, 1, 30 micrones, 35 micrones, etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través del pasaje nasal o mediante inhalación a través de la boca de manera de alcanzar los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para la administración mediante aerosol o polvo seco se pueden preparar de acuerdo con los métodos convencionales y se pueden administrar con otros agentes terapéuticos tales como los compuestos que se usan en la actualidad en el tratamiento o profilaxis de una condición dada.

**[306]** Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas para inyección que pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

**[307]** Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis única o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, y se pueden almacenar en una condición seca por congelamiento (liofilizada) que requiere solo el agregado del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito precedentemente. Las formulaciones de dosificación unitaria ejemplificativas son

aquellas que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, como se describe precedentemente en la presente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

**[308]** Se debe comprender que, además de los ingredientes que se mencionaron de manera particular precedentemente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en el arte que tienen relación con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

**[309]** La invención además provee composiciones veterinarias que comprenden por lo menos un ingrediente activo como se definió precedentemente junto con un vehículo veterinario correspondiente. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de la administración de la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que son de otra manera inertes o aceptables en el arte veterinario y que son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía oral, parenteral o mediante cualquier otra ruta deseada.

### **5.3.5 Composiciones farmacéuticas**

**[310]** La presente divulgación también provee composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, vectores para vacunas contra el coronavirus, o vacunas contra el coronavirus que se describen o ejemplifican en la presente, o cualquier combinación de las mismas. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la inoculación, por ejemplo, administración nasal, ocular, parenteral u oral. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas además comprenden

soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas además comprenden agentes o excipientes auxiliares, como es conocido en el arte. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas se presentan en la forma de una dosis individual (dosis unitaria). Por ejemplo, las vacunas contra el coronavirus pueden contener aproximadamente entre 0,1 y 200 µg, por ejemplo, entre 30 y 100 µg o entre 15 y aproximadamente 100 µg, de cada proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que entra en su composición. En algunos aspectos, la vacuna que forma el principal constituyente de la composición de la vacuna puede comprender un virus único que codifica para una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, o dos o más virus que codifican para una combinación de antígenos de coronavirus, por ejemplo, por lo menos dos o tres antígenos diferentes de coronavirus, en donde por lo menos uno de los cuales es una proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma.

**[311]** Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y/o emulsiones estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes o excipientes auxiliares conocidos en el arte. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se pueden usar vehículos o vendajes oclusivos para aumentar la permeabilidad en piel y potenciar la absorción del antígeno. Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden comprender en general una solución liposomal que contiene la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para suspender los liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes usados habitualmente en el

arte, tales como el agua purificada. Además de los diluyentes inertes, dichas composiciones también pueden incluir adyuvantes, agentes de humectación, agentes emulsionantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, saborizantes o perfumantes.

**[312]** Tal como resultará evidente para un experto en la materia, la concentración óptima del agente activo en una composición farmacéutica de la divulgación necesariamente dependerá del o de los agentes específicos usados, las características del mamífero, el tipo y la cantidad de adyuvante, si está presente, y/o la naturaleza de la infección. Estos factores pueden ser determinados por un experto en las artes médicas y farmacéuticas en vista de la presente divulgación.

**[313]** Las dosificaciones específicas se pueden ajustar dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, el origen étnico, las condiciones de salud general, sexo, dieta, estilo de vida y/o régimen terapéutico actual del mamífero, así como también para intervalos de dosis pretendidos, rutas de administración, tasa de excreción, y combinaciones de fármacos.

**[314]** Además de los polinucleótidos, las construcciones de ácido nucleico, las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, los vectores para vacunas contra el coronavirus, o las vacunas contra el coronavirus que se describen o ejemplifican en la presente, la composición farmacéutica puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo aceptable para la administración de una composición a mamíferos, que comprende uno o más excipientes no tóxicos que no reaccionan ni reducen la eficacia de los agentes farmacológicamente activos contenidos en

la presente. La proporción y el tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable en la composición farmacéutica puede variar dependiendo de la ruta elegida para su administración. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones de la presente divulgación se describen en los textos de farmacia estándares. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18<sup>va</sup> Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990). Los ejemplos no limitantes específicos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

**[315]** En algunos aspectos, la composición farmacéutica además comprende cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes que potencian la eficacia de la preparación, estabilizantes, conservantes, y similares.

**[316]** En algunos aspectos, la composición farmacéutica además comprende un ácido biliar o un derivado del mismo, en particular en la forma de una sal. Estos incluyen derivados de ácido cólico y sales de los mismos, en particular sales de sodio de ácido cólico o derivados de ácido cólico. Los ejemplos de ácidos biliares y derivados de los mismos incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y derivados tales como derivados glico, tauro, amidopropil-1-propanosulfónico y amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los ácidos biliares mencionados precedentemente, o N,N-bis(3Dgluconoamidopropil)desoxicolamida. Un ejemplo particular es el desoxicolato de sodio (NaDOC).

**[317]** Los ejemplos de estabilizantes adecuados incluyen inhibidores de proteasas, azúcares tales como sacarosa y glicerol, polímeros encapsulantes,

agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteínas y polipéptidos tales como gelatina y poliglicina y combinaciones de los mismos.

**[318]** En algunos aspectos, la composición farmacéutica además comprende uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para la inclusión en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, a título enunciativo no taxativo, aquellos que son bien conocidos en el arte, tales como adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), escualeno, escualano, alumbre, y diferentes aceites, los cuales se encuentran disponibles de diferentes fuentes, tales como Novartis (por ejemplo, adyuvante MF59 de Novartis).

**[319]** Dependiendo de la ruta de administración, las composiciones (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) pueden tomar la forma de una solución, suspensión, emulsión, o similar. Una composición se puede administrar mediante una ruta de administración bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas a un mamífero, por ejemplo, humanos y otros mamíferos. Las composiciones se pueden formular para una ruta particular de administración, por ejemplo, formuladas para la administración oral, administración nasal, o administración intravenosa.

**[320]** Para la administración parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o intradérmica), las composiciones (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) pueden comprender además vehículos farmacéuticamente aceptados. Para la administración mediante inyección, la composición puede estar en una solución en un vehículo acuoso estéril que también puede contener otros solutos tales como soluciones amortiguadoras o conservantes, así como también cantidades suficientes de sales farmacéuticamente aceptables o de glucosa para hacer isotónica a la solución.

**[321]** Las composiciones (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) se pueden administrar al sistema respiratorio, por ejemplo, a la nariz, cavidades de los senos, membranas de los senos o pulmones, de cualquier manera adecuada, tal como mediante inhalación a través de la boca o por vía intranasal. La composición se puede dispensar como una aspersion nasal en polvo o líquida, suspensión, gotas nasales, un gel o ungüento, a través de un tubo o catéter, mediante una jeringa, mediante un packtail, mediante compresas, o mediante infusión submucosal. La composición se puede administrar de manera conveniente en la forma de una aspersion en aerosol usando un envase presurizado o un nebulizador y un propelente adecuado, por ejemplo, sin

limitación, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser controlada mediante la provisión de una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular de manera de contener una mezcla de polvo de la composición y un polvo base adecuado tal como lactosa o almidón. Los ejemplos de formulaciones intranasales y métodos de administración se pueden encontrar en las Publicaciones PCT WO 01/41782, WO 00/33813, y en las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.180.603; 6.313.093; y 5.624.898, las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia y para todos los propósitos. Un propelente para una formulación en aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono, o un solvente de bajo punto de ebullición basado en hidrocarburos. La composición se puede administrar de manera conveniente en la forma de una presentación de aspersion en aerosol con un nebulizador o similar. En algunos aspectos, los ingredientes activos se micronizan de manera adecuada de manera de permitir la inhalación sustancialmente de todos los ingredientes activos en los pulmones al administrar la formulación en polvo seco, por lo tanto los ingredientes activos tendrán un tamaño de partícula menor que 100 micrones (por ejemplo, menor que 20 micrones, entre 1 y 10 micrones, o entre 0,2 y 0,4 micrones). En algunos aspectos, la composición está empaquetada en un dispositivo que puede proveer una cantidad predeterminada, y en general eficaz, de la composición farmacéutica por medio de inhalación, por ejemplo, un aspersor o inhalador nasal.

**[322]** En algunos aspectos, la composición (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) se administra en forma profiláctica. Por ejemplo, la administración de la composición puede comenzar antes o al momento de la infección. En algunos aspectos, la composición se administra hasta aproximadamente 1 mes o más (por ejemplo, hasta aproximadamente 4 meses o más) antes que el mamífero se exponga a un coronavirus. En algunos aspectos, la composición se administra tan pronto como 1 semana antes de la infección (por ejemplo, entre 1 y 5 días antes de la infección).

**[323]** En algunos aspectos, la composición (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) se presenta en una dosis individual o dividida en dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, en forma de dos, tres, cuatro o más subdosis por día. En algunos aspectos, se administra una dosis de la composición en un determinado día, seguido por una o más dosis de refuerzo espaciadas según se desee. En algunos aspectos, se da una vacunación inicial, seguida por un refuerzo de la misma vacuna entre aproximadamente una semana y aproximadamente dos meses (por ejemplo, aproximadamente dos semanas, aproximadamente tres semanas, aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente cinco semanas, aproximadamente seis semanas,

aproximadamente siete semanas, o aproximadamente ocho semanas) después de la vacunación inicial.

**[324]** La dosificación de una vacuna de virus vivo para un animal tal como un organismo mamífero adulto puede ser de entre aproximadamente  $10^2$  y  $10^{15}$ , por ejemplo, entre  $10^3$  y  $10^{12}$  unidades formadoras de placas de lisis (PFU)/kg, o cualquier rango o valor entre los mismos. Para los poxvirus (por ejemplo, virus vacuna o MCA) que expresan una o más proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas, la dosificación de PFU o proteína MoCoV S inmunorreactiva o fragmento antigénico de la misma en cada dosis de la vacuna de virus replicado se puede estandarizar para contener una cantidad adecuada, por ejemplo, entre 30 y 100  $\mu\text{g}$ , tal como entre 15 y 100  $\mu\text{g}$ , o cualquier rango o valor entre los mismos, o la cantidad recomendada por las agencias de gobierno u organizaciones profesionales reconocidas. Si el poxvirus expresa una proteína de coronavirus diferente o fragmento antigénico de la misma, la proteína puede estandarizarse.

**[325]** En algunos aspectos, los rangos de dosificación terapéuticamente eficaces y óptimos para las composiciones (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) se pueden determinar usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden inocular sujetos voluntarios o animales de prueba con dosificaciones variables a intervalos programados y se pueden evaluar muestras de sangre de prueba para ver los niveles de anticuerpo y/o actividad neutralizante de coronavirus presente en la sangre, por ejemplo, por análisis de

transferencia Western. Dichos resultados se pueden usar para refinar una dosificación de inmunización optimizada y un esquema para la inmunización eficaz de sujetos mamíferos, específicamente humanos.

### **5.3.6 Células huéspedes**

**[326]** La presente divulgación también provee células huéspedes (por ejemplo, células huéspedes recombinantes) que comprenden uno o más polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, vectores para vacunas contra el coronavirus, o proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas que se describen en la presente o cualquier combinación de las mismas. Las células huéspedes incluyen células procariotas, células eucariotas inferiores tales como levaduras, otras células eucariotas tales como células de insecto, y células eucariotas superiores tales como células de mamífero. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula huésped de humano. En algunos aspectos, la célula huésped es una línea celular. Las células huéspedes de mamífero incluyen, a título enunciativo no taxativo, las células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce en forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030, COS (por ejemplo, COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10, HBK, NSO, HT1080 y HsS78Bst.

**[327]** En algunos aspectos, las células huéspedes se preparan mediante la introducción de los polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, o vectores para vacunas contra el coronavirus que se describen en la presente dentro de las células mediante técnicas de fácil disponibilidad para los expertos en la materia. Estas incluyen, a título enunciativo no taxativo, transfección mediada

por fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, lipofección y otras técnicas tales como las que se hallan en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

### **5.3.7 Kits y Envases**

**[328]** La presente divulgación también provee envases que comprenden cualquier composición (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma, o composición farmacéutica) descrita o ejemplificada en la presente. En algunos aspectos, el envase es un vial de vidrio.

**[329]** La presente divulgación también provee kits que comprenden por lo menos una composición (por ejemplo, polinucleótido, construcción de ácido nucleico, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma, o composición farmacéutica) descrita y ejemplificada en la presente. Los kits se pueden usar para suministrar polinucleótidos, vectores, vacunas, composiciones farmacéuticas, y otros agentes para usar en métodos diagnósticos, de investigación básica, o terapéuticos, entre otros.

**[330]** En algunos aspectos, el kit además comprende un vial de vidrio. En algunos aspectos, el kit además comprende instrucciones para usar la composición (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el

coronavirus, proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma, o composición farmacéutica que se describe o ejemplifica en la presente) en un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus. En algunos aspectos, el kit además comprende instrucciones para usar la composición (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma, o composición farmacéutica que se describe o ejemplifica en la presente) en un método para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite.

#### **5.3.8 Métodos**

**[331]** La presente divulgación también provee métodos para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus, en donde el método comprende administrar al sujeto una o más dosis (por ejemplo, una cantidad eficaz) de cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente.

**[332]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra el uno o más antígenos de coronavirus. En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el

coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra los antígenos de coronavirus de por lo menos dos cepas de coronavirus diferentes. En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra los antígenos de coronavirus de por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve, por lo menos diez, o por lo menos once cepas de coronavirus diferentes. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E, HCoV-NL63, BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3 y BtCoV-279. En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica en el sujeto contra uno o más antígenos de coronavirus de un coronavirus surgido recientemente.

**[333]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica

adaptativa en el sujeto contra por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus y una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus.

**[334]** Una respuesta inmunológica adaptativa a una composición o vacuna es el desarrollo en el organismo huésped de una respuesta inmunológica celular y/o humoral (por ejemplo, mediada por anticuerpos) contra un polipéptido viral, por ejemplo, una preparación, polipéptido viral administrado o uno codificado por una molécula de ácido nucleico administrada, que puede prevenir o inhibir la infección por virus estructuralmente relacionados en forma estrecha, así como también virus relacionados en forma más distante. Usualmente, dicha respuesta implica que el sujeto produzca anticuerpos, células B, células T colaboradoras, células T supresoras, y/o células T citotóxicas dirigidas específicamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés.

**[335]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma se administran al sujeto mediante una ruta de administración bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal,

intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas.

**[336]** En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos, el sujeto es un humano.

**[337]** La presente divulgación también provee métodos para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por coronavirus en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende administrar una o más dosis (por ejemplo, una cantidad eficaz) de cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma al sujeto.

**[338]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma previenen, reducen la incidencia, atenúan o tratan la infección con una cepa de coronavirus que se selecciona del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63. En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma previenen, reducen la incidencia, atenúan o tratan la infección con un coronavirus surgido recientemente.

**[339]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el

coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma previenen, reducen la incidencia, atenúan o tratan la infección con por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco cepas diferentes de coronavirus. En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma previenen, reducen la incidencia, atenúan o tratan la infección con un coronavirus surgido recientemente y por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco cepas diferentes de coronavirus. En algunos aspectos, las cepas de coronavirus se seleccionan del grupo que consiste en: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-229E y HCoV-NL63.

**[340]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma son eficaces para inducir una respuesta inmunológica adaptativa en el sujeto contra por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus. En algunos aspectos, la respuesta inmunológica adaptativa es una respuesta celular de células T contra el por lo menos un antígeno de coronavirus y una respuesta humoral de anticuerpos contra el por lo menos un antígeno de coronavirus.

**[341]** En algunos aspectos, la una o más dosis del polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma se administran al sujeto mediante una ruta de administración bucal, epidérmica, epidural, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intracoronaria, intradérmica, intralesional, intralinfática, intramuscular, intranasal, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intratecal, intravenosa, mucosal, oral, rectal, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, subcuticular, sublingual, tópica, transtraqueal, o vaginal o cualquier combinación de las mismas.

**[342]** En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos, el sujeto es un humano.

**[343]** El proceso de administración puede variar, dependiendo del agente o agentes y del efecto deseado. Por lo tanto, el proceso de administración involucra la administración de un agente terapéutico (por ejemplo, cualquier polinucleótido, construcción de ácido nucleico, composición farmacéutica, vector para vacunas contra el coronavirus, vacuna contra el coronavirus, o proteína MoCoV S o fragmento antigénico de la misma que se describe o ejemplifica en la presente) a un paciente que requiere dicho tratamiento. Los métodos para administrar composiciones que comprenden vacunas de ADN se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.945.050 y 5.036.006.

**[344]** La administración se puede lograr mediante cualquier medio apropiado para el agente terapéutico, por ejemplo, mediante una vía de administración parenteral, mucosal, pulmonar, tópica, basada en catéter u oral. La administración parenteral puede incluir por ejemplo, subcutánea, intravenosa,

intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intralinfática e inyección en el tejido de un órgano. La administración mucosal puede incluir, por ejemplo, la administración intranasal, preferiblemente administrada en las vías aéreas de un paciente, es decir, nariz, senos, garganta, pulmones, por ejemplo, como gotas nasales, mediante nebulización, vaporización, u otros métodos conocidos en el arte. La administración oral o intranasal puede incluir la administración de un propelente. La administración pulmonar puede incluir la inhalación del agente. La administración basada en catéter puede incluir la administración mediante administración basada en catéter iontoforético. La administración oral puede incluir la administración de una píldora recubierta, o la administración de un líquido por boca. La administración en general también puede incluir la administración con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, una solución amortiguadora, un polipéptido, un péptido, un conjugado polisacárido, un liposoma, y/o un lípido, de acuerdo con métodos conocidos en el arte.

**[345]** En algunos aspectos, la cantidad eficaz de un vector viral (por ejemplo, un poxvirus tal como MVA) o partícula similar a virus puede ser entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  UFP o TCID<sub>50</sub>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFP o TCID<sub>50</sub>, que se puede administrar como una dosis individual o en dos o más dosis, o cada dosis puede incluir entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  UFP o TCID<sub>50</sub>, por ejemplo, entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFP o TCID<sub>50</sub>. Por ejemplo, cada dosis puede tener el mismo número de UFP, o la o las dosis de refuerzo pueden tener cantidades mayores o menores en relación con la dosis inicial. El refuerzo inicial se puede administrar entre 1 y 8 semanas después de la dosis de sensibilización, por ejemplo, 3 a 4 semanas

después de la dosis de sensibilización. La dosis de sensibilización y/o la o las dosis de refuerzo pueden incluir un adyuvante.

**[346]** La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología que se encuentran dentro de las habilidades del arte. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2da ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook y col., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis y col. Patente de los EE.UU. No. 4.683.195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu y col., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir y Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); Crooks, *Antisense drug Technology: Principles, strategies y applications*, 2<sup>da</sup> Ed. CRC Press (2007) y en Ausubel y col. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley y Sons, Baltimore, Md.).

[347] Todas las referencias citadas precedentemente, así como también todas las referencias citadas en la presente y las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos (por ejemplo, números de GenBank y/o números de Uniprot), se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[348] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración pero no a modo de limitación.

## **6. EJEMPLOS**

### **6.1. Generación *In Silico* de Secuencias de Proteínas de la Espícula Mosaico de Coronavirus**

[349] Se descargó un total de 552 secuencias de proteínas de la espícula (S) de coronavirus de diversas cepas de coronavirus de humano (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, MERS-CoV, SARS-CoV, y SARS-CoV-2) y cepas de beta coronavirus de murciélago estrechamente relacionadas (BtCoV-HKU4, BtCoV-HKU5, BtCoV-HKU9, BtCoV-273, BtCoV-HKU3, BtCoV-279) (FIG. 1) disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) y se cribaron para excluir secuencias duplicadas, parciales, incompletas o incorrectas (FIG. 2A). Las secuencias de proteínas S de coronavirus resultantes del recorte se usaron para generar *in silico* tres secuencias de proteínas S mosaico de coronavirus (MoCoV) (M1, M2, y M3) optimizadas para un número máximo de potenciales epitopes para células T (PTE) presentes en las secuencias de la glicoproteína de la espícula del coronavirus. En particular, la M1 se optimizó para un número máximo de PTE presentes en las secuencias de la glicoproteína de la espícula de coronavirus de HCoV-OC43, las cepas de beta coronavirus de murciélago, y siete variantes del SARS-CoV-2. La M2 se optimizó para un número máximo de

PTE presentes en las secuencias de la glicoproteína de la espícula de coronavirus del MERS-CoV. La M3 se optimizó para un número máximo de PTE presentes en las secuencias de la glicoproteína de la espícula de coronavirus de HCoV-NL63 y HCoV-229E.

**[350]** Para generar las secuencias de las proteínas M1, M2, y M3, se usó un “algoritmo genético” (por ejemplo, la herramienta de diseño de vacunas epígrafe desarrollada por Los Alamos National Labs para el trabajo con VIH y disponible en <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/EPIGRAPH/epigraph.html>) para generar, seleccionar, y “recombinar” (*in silico*) los epitopes potenciales para células T (9 aminoácidos de longitud) en proteínas “mosaico”, que pueden proveer una mayor cobertura de las cepas de coronavirus, y por lo tanto una inmunogenicidad optimizada, en comparación con cualquier proteína S individual de coronavirus de tipo salvaje (FIG. 2A). En las opciones de parámetros, el parámetro de longitud de epitope se configuró a una longitud de aminoácidos de 9. El parámetro de número de ensayos se configuró a 1 con 0 pasos de refinamiento iterativos. El parámetro de semillas aleatorias se configuró a 0, y se eliminaron los epitopes con 2 conteos o menos.

**[351]** La secuencia mosaico representa la secuencia completa o de longitud completa de la proteína y/o de las regiones de interés, así como también la diversidad completa de las secuencias “centrales” provistas. El uso de una secuencia mosaico para una vacuna contra el VIH-1, que recombinaba epitopes potenciales para células T en las proteínas Gag, Pol, y Env, ya se ha informado (Fischer y col., *Nature Medicine* 13:100 (2007)). La cobertura antigénica combinada de las proteínas mosaico M1, M2, y M3 es de 85%, que es similar a

los resultados de las proteínas mosaico previamente descritas y eficaces (Callaway, E., *Nature* 579(7800):481 (2020)).

**[352]** La estrategia *in silico* descrita precedentemente para las proteínas mosaico M1, M2, y M3 también se usó para generar tres proteínas MoCoV S adicionales — MB, M4, y M5. Para la MoCoV MB, se descargaron diversas secuencias de proteínas completas (10.000 secuencias) de la proteína S de SARS-CoV-2 de la cepa de coronavirus de humanos de los diferentes continentes disponibles en la base de datos de virus del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (América del Norte, América del Sur, Europa, África, Oceanía y Asia) en un rango de fechas entre junio de 2020 y septiembre de 2020. Las secuencias de proteínas S de SARS-CoV-2 se cribaron para excluir secuencias duplicadas, parciales, incompletas o incorrectas, y se creó una base de datos de secuencias de proteínas S de SARS-CoV-2 correspondientes a todos los continentes (entre 100 y 500 secuencias). Se usó la herramienta de diseño de vacunas epígrafe para generar, seleccionar, y “recombinar” (*in silico*) epitopes potenciales para células T (9 aminoácidos de longitud) a partir de la base de datos de secuencias de proteínas S de SARS-CoV-2 en la proteína mosaico MB.

**[353]** Para la MoCoV M4, se descargaron diversas secuencias completas de ácido nucleico que codifican para proteínas S de SARS-CoV-2 de la cepa de coronavirus de humanos, que incluyeron secuencias de Reino Unido, Brasil y Sudáfrica, a partir de la base de datos GISAID. Las secuencias de ácido nucleico se cribaron para excluir secuencias duplicadas, parciales, incompletas o incorrectas y se tradujeron a secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos resultantes se alinearon y usaron para crear una base de datos de

secuencias. La base de datos de secuencias además contuvo las secuencias de proteínas S de SARS-CoV-2 obtenidas de un huésped inmunocomprometido (Choi, B., y col., *N Engl J Med.* 383(23):2291-2293 (2020)). Se usó la herramienta de diseño de vacunas epígrafe para generar, seleccionar, y “recombinar” (*in silico*) epitopes potenciales para células T (9 aminoácidos de longitud) a partir de la base de datos de secuencias de proteínas S de SARS-CoV-2 en la proteína mosaico M4.

**[354]** Para la MoCoV M5, inicialmente se descargaron 448 secuencias de proteínas S de MERS-CoV y 54 secuencias de proteínas S de coronavirus (CoV) de murciélago similares a SARS. Las secuencias de ácido nucleico se cribaron para excluir secuencias duplicadas, parciales, incompletas o incorrectas y se tradujeron a secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos resultantes se alinearon y usaron para crear una primera base de datos de secuencias. A partir de la primera base de datos de secuencias, se probaron diferentes proporciones de secuencias de proteínas S de MERS-CoV y CoV de murciélago similares a SARS (es decir, diferentes proporciones de MERS-CoV: CoV de murciélago similares a SARS) usando la herramienta de diseño de vacunas epígrafe para obtener un mosaico que incluyera fragmentos de ambos grupos. Para la mayoría de las combinaciones, se obtuvieron mosaicos con una secuencia idéntica a la proteína S de MERS-CoV excepto cuando: (1) se tomaron 36 secuencias de proteínas S de MERS-CoV y (2) se tomaron 54 secuencias de proteínas S de coronavirus de murciélago similares a SARS, o combinaciones cercanas a estas. Por lo tanto, se creó una segunda base de datos de secuencias usando 36 secuencias de proteínas S de MERS-CoV y 54 secuencias de proteínas S de CoV de murciélago similares a SARS a partir de la primera base

de datos de secuencias. Se usó la herramienta de diseño de vacunas epígrafe para generar, seleccionar, y “recombinar” (*in silico*) epitopes potenciales para células T (9 aminoácidos de longitud) a partir de la segunda base de datos de secuencias de proteínas S de MERS-CoV y CoV de murciélago similares a SARS en una proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS (SEQ ID NO: 18).

**[355]** La secuencia de la proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS obtenida de la segunda base de datos de secuencias es idéntica a la secuencia de la proteína S de MERS-CoV en las regiones del dominio N terminal (NTD) y del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S de MERS-CoV, mientras que el resto de la secuencia de la proteína S de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS tiene una mayor similitud a la proteína S del CoV de murciélago similar a SARS Rs3367. La proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS tiene un 82% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína S de MERS-CoV y 48% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína S del CoV de murciélago similar a SARS Rs3367. La cobertura antigénica combinada que se obtuvo para la proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS fue de 41,4%, debido a la diferencia entre los virus MERS-CoV y CoV de murciélago similares a SARS. Se usó la herramienta de diseño de vacunas epígrafe para evaluar la cobertura antigénica de la proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS con respecto al grupo de las secuencias de proteínas S de MERS-CoV y el grupo de las secuencias de proteínas S de CoV de murciélago similares a SARS. La proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS tiene una cobertura antigénica de 67,7% para el

grupo de secuencias de proteínas S de MERS-CoV y 23,1% para el grupo de secuencias de proteínas S de CoV de murciélago similares a SARS.

**[356]** Previamente se demostró que las sustituciones de prolina en las posiciones de aminoácido 1060 y 1061 (V1060P y L1061P) de la proteína S de MERS-CoV estabilizan la proteína S de MERS-CoV en la conformación de prefusión e incrementan mucho la expresión y el rendimiento de la proteína S de MERS-CoV. Véase Pallesen, J. y col., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35): E7348-E7357 (2017). Por lo tanto, se generó la MoCoV M5 (SEQ ID NO: 13) modificando la secuencia de la proteína S mosaico de MERS-CoV/CoV de murciélago similares a SARS para introducir las sustituciones de aminoácido K1060P y L1061P.

**[357]** Se cuantificaron las mutaciones de las 448 secuencias de proteínas S de MERS-CoV de la primera base de datos de secuencias con el objetivo de conocer qué mutaciones son las más frecuentes y sus posibles efectos entre la proteína S y la célula diana. Se identificaron 160 mutaciones de la proteína S de MERS-CoV pero solo 13 de las mutaciones tuvieron frecuencias representativas entre las 448 secuencias de proteínas S de MERS-CoV (Tabla 1).

**Tabla 1: Frecuencias Representativas de Mutaciones de la Proteína S de MERS-CoV**

| <b>Mutación</b> | <b>Frecuencia</b> | <b>Región de la Proteína S</b> |
|-----------------|-------------------|--------------------------------|
| T95I            | 9                 | Dominio N Terminal             |
| S126A           | 20                | Dominio N Terminal             |
| D158Y           | 9                 | Dominio N Terminal             |
| F228L           | 20                | Dominio N Terminal             |
| L411F           | 29                | Dominio de Unión al Receptor   |

|        |    |                              |
|--------|----|------------------------------|
| T424I  | 12 | Dominio de Unión al Receptor |
| F473S  | 18 | Dominio de Unión al Receptor |
| D510G  | 7  | Dominio de Unión al Receptor |
| I529T  | 24 | Dominio de Unión al Receptor |
| L745F  | 19 |                              |
| Q833R  | 33 |                              |
| A1193S | 28 |                              |
| Q1208H | 19 |                              |
| V1314A | 7  | Dominio Transmembrana        |

**[358]** Se había informado previamente que las mutaciones D510G y I529T de la proteína S de MERS-CoV que se muestran en la Tabla 1 incrementan la resistencia de la entrada dirigida por la proteína S a la neutralización mediante los anticuerpos monoclonales y los sueros de los pacientes de MERS. Véase Klein-Weber, H. y col., *Journal of Virology*, 93(2): e01381-18 (2019).

**[359]** La FIG. 2A-2B provee un esquema de un ejemplo de estrategia con vacuna mosaico, que fue la estrategia que se usó para generar las secuencias mosaicos de M1, M2, M3, M4, M5, y MB. Se seleccionan secuencias naturales, por ejemplo, de aislados a campo, de una diversidad de coronavirus. Se eliminan las repeticiones de secuencias. Se generan poblaciones de secuencias recombinadas *in silico*, y se compara la cobertura de una secuencia de cada población con la secuencia natural, por ejemplo, como si la misma fuese la secuencia representativa de la población. Se evalúa una secuencia mosaico representativa de cada población para ver su aptitud. En general se excluyen las secuencias representativas con epítopes para células T raros. Para hacer

evolucionar aún más las secuencias, se pueden recombinar *in silico* las secuencias mosaicos parentales, por ejemplo, tomando pares de secuencias parentales al azar, para generar secuencias hijas. Se determina la aptitud de la o las secuencias hijas al azar y si la aptitud tiene una mejor cobertura que las secuencias de entrada, la parental con la menor puntuación se reemplaza por la secuencia hija con la mayor puntuación o, si la puntuación de la secuencia hija es la más alta para la población, la misma es la representativa para esa población. La determinación de la puntuación de las secuencias representativas en una población se puede repetir hasta que la aptitud ya no mejore más, por ejemplo, durante un número de ciclos tal como de 10 ciclos.

## **6.2. Construcción de Vacunas de Proteína S Mosaico En Base a Pox**

[360] Las tres secuencias mosaicos de M2, M3, y MB que se generaron *in silico* se retrotradujeron, se optimizaron sus codones, y se modificaron para reducir la estructura secundaria del ARN y para eliminar los sitios de entrada a ribosoma y las secuencias de terminación de la transcripción (por ejemplo, TTTTNT) (FIG. 2B). Las secuencias mosaicos M2, M3, y MB optimizadas se sintetizaron entonces en forma comercial (GenScript USA, Inc.) y se clonaron en un vector para vacunas de virus vacuna Ankara modificado (MVA) (Brewoo y col., *Vacuna* 31:1848 (2013) para generar el vector para vacunas basado en MoCoV MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (FIG. 3C). El MVA se considera como uno de los vectores para vacunas recombinantes más avanzados; se ha evaluado en diferentes modelos animales como candidato vacunal contra muchas infecciones virales, bacterianas y parasíticas. El vector MVA-MoCoV-MB-M2-M3 ejemplificado en la presente contiene promotores nuevos y fuertes, potenciadores de la

transcripción, y señales de secreción para optimizar la expresión de antígeno, lo que finalmente proveerá mejores respuestas inmunológicas.

**[361]** Para coexpresar las tres proteínas mosaico MB, M2, y M3 a partir del vector MVA-MoCoV-MB-M2-M3, se diseñaron dos casetes de expresión (FIGS. 3A-3C). El primer casete de expresión se insertó en el locus de la timidina quinasa (TK) del vector para vacunas MVA y codifica para la MB y los marcadores de selección GFP (proteína fluorescente verde) y GPT (xantina guanina fosforribosil transferasa), que ayudará en el proceso de detección y selección del virus recombinante, y los segmentos de ADN del gen TK (flanco 1 y flanco 2) para dirigir el evento de inserción génica (FIGS. 3B y 3C). El segundo casete se insertó en el gen de la hemaglutinina (HA) y contiene los mosaicos M2 y M3, un gen mCherry (proteína fluorescente), que ayuda a detectar el virus recombinante, y los segmentos de ADN del locus HA (flanco 1 y flanco 2) (FIGS. 3A y 3C).

### **6.3. Análisis de la Expresión de la Proteína MoCoV S a partir de los Vectores para Vacuna Basados en MoCoV**

**[362]** Se analizó la expresión de la proteína MoCoV S a partir de los vectores para vacunas basados en MoCoV por análisis de transferencia Western. Se infectaron fibroblastos de embrión de pollo (células DF-1) con el vector para vacunas basado en MoCoV MoCoV-MB-M2-M3 o bien con un vector MVA control a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 PFU/célula. Las células infectadas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los pellets de las células infectadas se cosecharon 24 horas después de la infección y se lisaron con solución amortiguadora para muestras de Laemmli (BioRad). Se fraccionaron las proteínas por SDS PAGE, y se transfirieron las proteínas a membrana de

nitrocelulosa para la detección de la proteína S mosaico usando suero de humanos convalecientes (anticuerpo primario) y un anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP (anticuerpo secundario). Se usó 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para visualizar la proteína S mosaico en las membranas. Cada monómero de proteína S homotrimérica de coronavirus tiene un peso molecular predicho en el rango entre aproximadamente 180 kDa y aproximadamente 200 kDa (Huang, Y., y col., *Acta Pharmacologica Sinica* 41:1141-1149 (2020)). Como se muestra en la FIG. 4, la proteína S mosaico (MB, M2, y M3) se detectó en la proteína cosechada de las células DF-1 infectadas con el vector para vacunas de MoCoV-MB-M2-M3 pero no en la proteína cosechada de las células infectadas con el vector MVA control. De esta manera estos datos demuestran la generación exitosa de un vector MVA que expresa las proteínas MoCoV S.

#### **6.4. Análisis de la Expresión de la Proteína MoCoV S mediante *Pichia pastoris***

**[363]** Se clonan uno o más ADNc que codifican para una proteína MoCoV S o un fragmento antigénico de la misma divulgado en la presente (por ejemplo, MB, M2, M3, M4, M5, M5 + D510G, M5 + I529T, M5 + D510G + I529T, fragmentos antigénicos de las mismas y cualquier combinación de las mismas) en uno o más vectores plasmídicos (por ejemplo, pGEX-6P-1 o pPICZα-A) usando métodos convencionales, tales como los que se describen en Chuck, C., y col., *Virus Genes* 38:1-9 (2009). Se llevan a cabo PCR y/o secuenciación de colonias usando cebadores para el vector para verificar que el uno o más ADNc están ligados en los sitios correctos. La expresión del uno o más ADNc se consigue en células de levadura de *Pichia pastoris* competentes (por ejemplo, *P. pastoris*

cepa KM71H) transformadas con el uno o más vectores plasmídicos usando métodos convencionales, tales como los que se describen en Chuck, y col. (2009) y Tan, W., y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 452:119 (2006)).

**[364]** Se cosechan las proteínas, y opcionalmente se purifican, a partir de las células de levadura de *Pichia pastoris* usando métodos convencionales, tales como los que se describen en Chuck, y col. (2009). Se fraccionan las proteínas mediante SDS PAGE, y se transfieren las proteínas a membrana de nitrocelulosa para la detección de la proteína S mosaico usando suero de humanos convalecientes (anticuerpo primario) y un anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP (anticuerpo secundario). Se usa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para visualizar la proteína S mosaico en las membranas. Cada monómero de proteína S homotrimérica de coronavirus tiene un peso molecular predicho en el rango entre aproximadamente 180 kDa y aproximadamente 200 kDa (Huang, Y., y col., *Acta Pharmacologica Sinica* 41:1141-1149 (2020)). La proteína S mosaico se detecta en las células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas con el uno o más vectores plasmídicos que contienen el ADNc, pero no en las células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas con uno o más plásmidos control que carecen del ADNc. Opcionalmente, el uno o más vectores plasmídicos que contienen el ADNc además codifican para uno o más marcadores de expresión (por ejemplo, uno o más marcadores de expresión fluorescentes, tales como una GFP), y se detecta la expresión del uno o más marcadores en las células de levadura de *Pichia pastoris* transformadas usando métodos convencionales, por ejemplo, por microscopía de fluorescencia. Dichos datos demuestran la exitosa expresión de las proteínas MoCoV S o fragmentos antigénicos de las mismas en *Pichia pastoris*.

### **6.5. Análisis de la eficacia de MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 en el enfrentamiento con el aislado de SARS-CoV-2 Washington en un modelo de ratón K18-hECA2**

[365] Los vectores para vacunas MoCoV-MB (también denominado en la presente "MB") y MoCoV-MB-M2-M3 (también denominado en la presente "MB 2.3") se generaron como se describió precedentemente en las secciones 6.1 y 6.2. En la FIG. 6A se muestra un ejemplo de curso temporal del experimento. En el día 0 del experimento, seis grupos que contenían ocho ratones K18-hECA2 (cinco semanas de edad) recibieron la administración de la vacuna o placebo a través de inyección intramuscular. Como se indica en la Tabla 2 más adelante, el grupo 1 y el grupo 2 recibieron la administración de  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB, el grupo 3 y el grupo 4 recibieron la administración de  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3, el grupo 5 recibió la administración de 50  $\mu$ L de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2 como control positivo, y el grupo 6 recibió la administración de un placebo (PBS) como control negativo. En el día 21 del experimento, el grupo 2 recibió la administración de otras  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB, el grupo 4 recibió la administración de otras  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3, y el grupo 5 recibió una dosis adicional de 50  $\mu$ L de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2. En el día 35 del experimento, se anestesiaron los animales con 5% de isoflurano, luego se enfrentó a los seis grupos con  $1 \times 10^5$  UFP de SARS-CoV-2 (aislado Washington) por administración intranasal. Diez días después de la infección (dpi) o cuando los animales alcanzaron los criterios de punto final (más de 20% de pérdida de peso corporal, distrés respiratorio, inapetencia, signos de deshidratación, falta

de movilidad o condición corporal crítica), los mismos se sacrificaron en forma humanitaria.

**[366]** Después de la eutanasia, se recolectaron varios tejidos. Se recolectó el pulmón derecho de ambas cepas de animales, se pesó, y se homogeneizó durante 1 minuto con esferas de diámetro entre 0,5 y 2,3 mm en 1 mL de Trizol usando un mezclador de esferas Biospec Mini. Luego se centrifugaron las muestras a 4°C y 10.000 g durante 5 minutos y se almacenó el sobrenadante a -80°C para la determinación de las cargas virales. Se recolectó el pulmón izquierdo, el corazón y riñón izquierdo de ambas cepas de animales, se llenaron con formalina amortiguada a pH neutro al 10% usando un catéter veterinario 26G y se conservaron en la formalina para la evaluación de los cambios histopatológicos.

**[367]** Se extrajo sangre de la vena maxilar usando una lanceta de 4 mm con entre 100 µl y 200 µl recolectados en tubos Microvette® 500 serum Z-Gel. La recolección de sangre se hizo en el día 21 y el día 35 antes de las administraciones de sustancias (por ejemplo, antes de la vacunación o el enfrentamiento). Se centrifugaron las muestras de sangre a 10.000xg durante 5 min a 20°C y se recolectó el suero y se almacenó a -80°C.

**Tabla 2 Estudios Preclínicos en Ratones por Enfrentamiento con Aislado Washington de SARS-CoV-2**

| Grupo<br>(N=8) | Vacuna   | Dosis de<br>Vacuna<br>(PFU) | Ruta | Refuerzo<br>(21 DPV) | Dosis de<br>Enfrentamiento<br>(PFU) |
|----------------|----------|-----------------------------|------|----------------------|-------------------------------------|
| 1              | MoCoV-MB | 5x10 <sup>7</sup>           | IM   |                      | 1x10 <sup>5</sup>                   |
| 2              | MoCoV-MB | 5x10 <sup>7</sup>           | IM   | Sí                   | 1x10 <sup>5</sup>                   |

|   |                |                   |    |    |                   |
|---|----------------|-------------------|----|----|-------------------|
| 3 | MoCoV-MB-M2-M3 | 5x10 <sup>7</sup> | IM |    | 1x10 <sup>5</sup> |
| 4 | MoCoV-MB-M2-M3 | 5x10 <sup>7</sup> | IM | Sí | 1x10 <sup>5</sup> |
| 5 | Espícula       | NA                | IM | Sí | 1x10 <sup>5</sup> |
| 6 | Negativo (PBS) | NA                | IM |    |                   |

PFU = unidades formadoras de placas de lisis; IM = ruta intramuscular; DPV = días después de la vacunación

**[368]** En las FIGS. 6B-6F se muestran los resultados de este estudio. Los animales K18-hACE-2 comenzaron a perder peso dos días después de la inyección. Todos los grupos vacunados se recuperaron en el día 3 y mantuvieron su peso corporal sin ninguna variación significativa. Todos los animales del grupo control continuaron perdiendo peso mostrando síntomas de enfermedad hasta que alcanzaron los criterios de punto final para eutanasia humanitaria en el día 6 después de la infección (FIG. 6B). Estos síntomas incluyeron reducción de la actividad, reducción de la condición corporal, posición encorvada, pelaje ondulado, descarga nasal y ocular. No hubo diferencias entre los grupos vacunados, solo el grupo control fue diferente. Estos datos demuestran que ambas vacunas de MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 confieren protección contra los efectos perjudiciales del SARS-CoV-2.

**[369]** Para todos los ratones ACE-2, todos los animales que recibieron vacunas basadas en MVA sobrevivieron al enfrentamiento letal con SARS-CoV-2, solo los animales del grupo control murieron a los 6 días después de la infección (FIG. 6C).

**[370]** Se analizó la actividad de los anticuerpos mediante pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (PRNT). Se obtuvieron muestras

de suero de cada ratón a los 21 días después de la vacunación y 35 días después de la vacunación. En este ensayo, las muestras de suero se inactivaron con calor mediante incubación a 56°C durante 30 minutos, se diluyeron en forma seriada al cuarto en 1X DMEM (dilución de trabajo en el rango entre 1:8 y 1:8192), se combinaron con un volumen igual de 800 UFP de SARS-CoV-2 (para diluciones finales de suero en el rango entre 1:16 y 1:16384), y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usaron cincuenta µl por pocillo de esta mezcla de virus y suero para infectar placas sembradas con células Vero E6 a una confluencia de 90% y se incubaron durante 2 horas. Después de la incubación, se extrajo el inóculo de la placa, y se agregaron 150 µl de solución de sobre capa por pocillo (1X DMEM con 2% de carboximetil celulosa [CMC] y 2% de FBS) y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La sobrecapa se descartó entre 24 y 36 horas después de la infección y se agregaron 200 µL de solución amortiguadora de fijación (75% de acetona, 15% de metanol, 5% de ácido acético glacial y 5% de PBS) por pocillo y se incubó durante 15 min a -20°C. Se lavaron las placas hasta eliminar completamente la sobrecapa (entre 3 y 4 veces). Se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal humano [CR3022] contra la Glicoproteína de la Espícula de SARS-CoV-2 S1 - ABCAM ab273073 y Anticuerpo Neutralizante Anti-RBD de Proteína de la Espícula de SARS-CoV-2, IgG1 Humana [AS35]- ACROBIOSYSTEMS) diluidos (1:2000) en solución amortiguadora de bloqueo (PBS-T [1X PBS+0,05% de Tween-20], leche en polvo al 5% y 5% de FBS) y se incubaron a 4°C durante una noche con agitación lenta constante. Después de lavar dos veces con PBS-T, se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario diluido (1:2000) (anticuerpo de cabra anti-IgG [H+L] de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se incubó a 37°C durante

1 hora con agitación lenta constante. Se lavaron las placas dos veces con PBS-T y se agregaron 100 µL/pocillo de sustrato Cromógeno/Peróxido y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar durante una noche. Se escanearon las placas usando un lector de placas ELISPOT (ImmunoSPOT-Cellular Technology). Se contó el número de focos de replicación en las placas escaneadas y se calcularon los valores de PRNT50 usando el programa de computación Viridot (Katzelnick y col. 2018). Los gráficos se hicieron con el programa de computación GraphPad Prism.

**[371]** Los animales K18-hACE-2 vacunados tuvieron títulos similares de anticuerpos neutralizantes (PRNT50). Los títulos se incrementaron con el refuerzo (en las muestras del día 35), sin embargo, no hubo ninguna diferencia significativa entre los grupos vacunados (FIGs. 6D-6E). Los grupos tratados con MoCoV-MB, refuerzo de MoCoV-MB, MoCoV-MB-M2-M3, refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 tuvieron un título medio por grupo de 982,97 (SD=866,86), 465,39 (SD=320,41) 353,37 (SD=169,91) y 567,58 (SD=486,94) para el día 21 y 2523,62 (SD=2518,16), 6511,27 (SD=5150,89), 549,12 (SD=442,75) y 3493,18 (SD=2885,68) para el día 35 respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50) contra SAR-CoV-2 cepa WA a los 21 y 35 días después de la vacunación para los ratones K18-hACE-2 vacunados.**

| Punto de Tiempo             | Grupo                      | Animal |         |         |         |        |         |         |         |         |         | Media   | SD      |
|-----------------------------|----------------------------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                             |                            | 1      | 2       | 3       | 4       | 5      | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      |         |         |
| PRNT50<br>títulos<br>21 dpv | MoCoV-MB                   | 943,93 | 3264,11 | 481,76  | 1477,13 | 354,5  | 962     | 614,75  | 704,07  | 595,39  | 432,05  | 982,97  | 866,86  |
|                             | refuerzo de MoCoV-MB       | 124,35 | 600,05  | 371,42  | 387,84  | 183,74 | 485,82  | 1241,71 | 652,94  | 256,32  | 349,72  | 465,39  | 320,41  |
|                             | MoCoV-MB-M2-M3             | 139,74 | 71,62   | 306,54  | 500,08  | 544,06 | 452,3   | 203,11  | 395,46  | 554,38  | 366,43  | 353,37  | 169,91  |
|                             | refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 163,6  | 289,92  | 445,75  | 422,59  | 81,3   | 139,25  | 1565,35 | 637,54  | 719,09  | 1211,37 | 567,58  | 486,94  |
|                             | Solución amortiguadora     | 0,00   | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00   | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    |
|                             | MoCoV-MB                   | 531,80 | 7821,67 | 2474,84 | 6424,60 | 460,63 | 1412,56 | 1568,09 | 1835,55 | 1666,82 | 1039,61 | 2523,62 | 2518,16 |

|                              |                            |             |              |             |              |             |              |             |             |             |             |             |             |
|------------------------------|----------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PRNT5<br>0 títulos<br>35 dpv | refuerzo de MoCoV-MB       | 8983,0<br>0 | 10337,9<br>0 | 0,00        | 12977,1<br>1 | 5550,4<br>9 | 13528,7<br>4 | 4582,3<br>1 | 0,00        | 699,90      | 8453,2<br>0 | 6511,2<br>7 | 5150,8<br>9 |
|                              | MoCoV-MB-M2-M3             | 498,44      | 103,53       | 652,89      | 385,31       | 472,20      | 455,38       | 1730,0<br>9 | 479,05      | 494,09      | 220,22      | 549,12      | 442,75      |
|                              | refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 9187,7<br>4 | 7402,93      | 4412,9<br>0 | 3942,56      | 381,21      | 591,15       | 1090,3<br>8 | 2852,0<br>5 | 2365,9<br>9 | 2704,9<br>3 | 3493,1<br>8 | 2885,6<br>8 |
|                              | Solución amortiguadora     | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |

[372] En conjunto, los mayores títulos de anticuerpos y las menores cargas virales de los ratones que recibieron la vacuna de MoCoV-MB o bien la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3 demostraron la eficacia de las vacunas contra el aislado Washington de SARS-CoV-2 en los ratones K18-hECA2.

#### **6.6. Análisis de la eficacia de MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 en el enfrentamiento con la variante sudafricana del SARS-CoV-2 en un modelo de ratón C57/BL6**

[373] Se generaron los vectores para vacunas MoCoV-MB y MoCoV-MB-M2-M3 como se describió precedentemente en las secciones 6.1 y 6.2. En la FIG. 6A se muestra un ejemplo de curso temporal del experimento. En el día 0 del experimento, seis grupos que contenían ocho ratones C57/BL6 (cinco semanas de edad) recibieron la administración de la vacuna o placebo a través de inyección intramuscular. Como se muestra en la Tabla 4 más adelante, el grupo 1 y el grupo 2 recibieron la administración de  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB, el grupo 3 y el grupo 4 recibieron la administración de  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3, el grupo 5 recibió la administración de 50  $\mu$ L de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2 como control positivo, y el grupo 6 recibió la administración de un placebo (PBS) como control negativo. En el día 21 del experimento, el grupo 2 recibió la administración de otras  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB, el grupo 4 recibió la administración de otras  $5 \times 10^7$  UFP de la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3, y grupo 5 recibió la administración de otros 50  $\mu$ L de la Proteína de la Espícula de SARS-CoV-2. En el día 35 del experimento, se anestesiaron los animales con 5% de isoflurano, luego se enfrentó a los seis grupos con  $6 \times 10^4$  UFP de SARS-CoV-2 5325 (Variante sudafricana) por administración intranasal. Se pesaron y se monitorearon los

animales para ver problemas de salud, pérdida de peso, inapetencia, reducción de actividad y problemas de respiración. Diez días después de la infección (dpi) o cuando los animales alcanzaron los criterios de punto final (más de 20% de pérdida de peso corporal, distrés respiratorio, inapetencia, signos de deshidratación, falta de movilidad o condición corporal crítica), los mismos se sacrificaron en forma humanitaria.

**[374]** Después de la eutanasia, se recolectaron varios tejidos. Se recolectó el pulmón derecho de ambas cepas de animales, se pesó, y se homogeneizó durante 1 minuto con esferas de diámetro entre 0,5 y 2,3 mm en 1 mL de Trizol usando un mezclador de esferas Biospec Mini. Luego se centrifugaron las muestras a 4°C y 10.000 g durante 5 minutos y se almacenó el sobrenadante a -80°C para la determinación de las cargas virales. Se recolectó el pulmón izquierdo, el corazón y riñón izquierdo de ambas cepas de animales, se llenaron con formalina amortiguada a pH neutro al 10% usando un catéter veterinario 26G y se conservaron en la formalina para la evaluación de los cambios histopatológicos.

**[375]** Se extrajo sangre de la vena maxilar usando una lanceta de 4 mm con entre 100 µl y 200 µl recolectados en tubos Microvette® 500 serum Z-Gel. La recolección de sangre se hizo en el día 21 y el día 35 antes de las administraciones de sustancias (por ejemplo, antes de la vacunación o el enfrentamiento). Se centrifugaron las muestras de sangre a 10.000xg durante 5 min a 20°C y se recolectó el suero y se almacenó a -80°C.

**Tabla 4: Estudios Preclínicos en Ratones por Enfrentamiento con la Variante sudafricana del SARS-CoV-2**

| Grupo (N=8) | Vacuna                      | Dosis de Vacuna (PFU) | Ruta | Refuerzo (21 DPV) | Dosis de Enfrentamiento (PFU) |
|-------------|-----------------------------|-----------------------|------|-------------------|-------------------------------|
| 1           | MoCoV-MB                    | $5 \times 10^7$       | IM   |                   | $6 \times 10^4$               |
| 2           | MoCoV-MB                    | $5 \times 10^7$       | IM   | Sí                | $6 \times 10^4$               |
| 3           | MoCoV-MB-M2-M3              | $5 \times 10^7$       | IM   |                   | $6 \times 10^4$               |
| 4           | MoCoV-MB-M2-M3              | $5 \times 10^7$       | IM   | Sí                | $6 \times 10^4$               |
| 5           | Proteína de la Espícula-GLA |                       | IM   | Sí                | $6 \times 10^4$               |
| 6           | Negativo (PBS)              | NA                    | IM   |                   | $6 \times 10^4$               |

PFU = unidades formadoras de placas de lisis; IM = ruta intramuscular; DPV = días después de la vacunación

**[376]** Se analizó la actividad de los anticuerpos mediante pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (PRNT). Se obtuvieron muestras de suero de cada ratón 21 días después de la vacunación y 35 días después de la vacunación. En este ensayo, las muestras de suero se inactivaron con calor mediante incubación a 56°C durante 30 minutos, se diluyeron en forma seriada al cuarto en 1X DMEM (dilución de trabajo en el rango entre 1:8 y 1:8192), se combinaron con un volumen igual de 800 UFP de SARS-CoV-2 (para diluciones

finales de suero en el rango entre 1:16 y 1:16384), y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usaron cincuenta µl por pocillo de esta mezcla de virus y suero para infectar placas sembradas con células Vero E6 a una confluencia de 90% y se incubaron durante 2 horas. Después de la incubación, se extrajo el inóculo de la placa, y se agregaron 150 µl de solución de sobre capa por pocillo (1X DMEM con 2% de carboximetil celulosa [CMC] y 2% de FBS) y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se descartó la sobrecapa entre 24 y 36 horas después de la infección y se agregaron 200 µL de solución amortiguadora de fijación (75% de acetona, 15% de metanol, 5% de ácido acético glacial y 5% de PBS) por pocillo y se incubó durante 15 min a -20°C. Se lavaron las placas hasta eliminar completamente la sobrecapa (entre 3 y 4 veces). Se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal humano [CR3022] contra la Glicoproteína de la Espícula de SARS-CoV-2 S1 - ABCAM ab273073 y Anticuerpo Neutralizante Anti-RBD de Proteína de la Espícula de SARS-CoV-2, IgG1 Humana [AS35]- ACROBIO SYSTEMS) diluidos (1:2000) en solución amortiguadora de bloqueo (PBS-T [1X PBS+0,05% de Tween-20], leche en polvo al 5% y 5% de FBS) y se incubaron a 4°C durante una noche con agitación lenta constante. Después de lavar dos veces con PBS-T, se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario diluido (1:2000) (anticuerpo de cabra anti-IgG [H+L] de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación lenta constante. Se lavaron las placas dos veces con PBS-T y se agregaron 100 µL/pocillo de sustrato Cromógeno/Peróxido y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar durante una noche. Se escanearon las placas usando un lector de placas ELISPOT (ImmunoSPOT-Cellular

Technology). Se contó el número de focos de replicación en las placas escaneadas y se calcularon los valores de PRNT50 usando el programa de computación Viridot (Katzelnick y col. 2018). Los gráficos se hicieron con el programa de computación GraphPad Prism.

**[377]** En las FIGS. 7A-7D se muestran los resultados de este estudio. Los animales no mostraron problemas de salud después de la vacunación y antes del enfrentamiento con SARS-CoV-2. Uno de los animales C57BL6J murió durante los procedimientos de extracción de sangre, y por lo tanto, se eliminó del estudio. Los animales C57BL6J no mostraron síntomas clínicos después del enfrentamiento, sin embargo, hubo una leve reducción de peso en el día 3 después de la infección para algunos animales (FIG. 7A). No se notaron diferencias entre los Grupos. Para los animales C57BL6J, todos los individuos sobrevivieron hasta el final de este estudio (FIG. 7B).

**[378]** Todos los animales C57BL6J vacunados tuvieron títulos similares de anticuerpos neutralizantes (PRNT50). Los títulos se incrementaron levemente con el refuerzo (en las muestras del día 35), sin embargo, no hubo evidencia de diferencias entre los animales tratados con las construcciones de vacuna (FIG. 7C-7D). Los grupos tratados con MoCoV-MB, refuerzo de MoCoV-MB, MoCoV-MB-M2-M3, refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 tuvieron un título medio PRNT50 por grupo de 969,64 (SD=1302,46), 503,64 (SD=582,08), 342,00 (SD=275,78), 1041,90 (SD=1304,25) para el día 21 y 1045,20 (SD=1158,52), 3286,57 (SD=3306,98), 175,16 (SD=124,65) y 1696,20 (SD=1295,26) para el día 35 respectivamente. Para el grupo tratado con la proteína de la espícula esto fue detectable solo a los 35 **días después de la vacunación** con un título PRNT50 medio de 467,76 (SD=783,38) (Tabla 5 más adelante).

**Tabla 5. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT<sub>50</sub>) contra SAR-CoV-2 cepa WA a los 21 y 35 dpv para los ratones C57BL6J vacunados 21 y 35 días después de la vacunación**

| Punto de Tiempo                   | Grupo                      | Animal |         |         |         |         |         |        |        | Media   | SD      |
|-----------------------------------|----------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
|                                   |                            | 1      | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7      | 8      |         |         |
| PRNT <sub>50</sub> títulos 21 dpv | MoCoV-MB                   | 305,37 | 1172,98 | 127,44  | 392,08  | 1074,59 | 4047,68 | 229,21 | 407,76 | 969,64  | 1302,46 |
|                                   | refuerzo de MoCoV-MB       | 453,90 | 65,77   | 68,80   | 1855,47 | 382,29  | 566,53  | 126,42 | 509,91 | 503,64  | 582,08  |
|                                   | MoCoV-MB-M2-M3             | 191,15 | 104,96  | 407,92  | 844,68  | 237,98  | 632,25  | 288,97 | 28,11  | 342,00  | 275,78  |
|                                   | refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 60,83  | 681,74  | 3913,96 | 329,54  | 1907,85 | 346,54  | 137,10 | 957,60 | 1041,90 | 1304,25 |
|                                   | Espícula                   | 0,00   | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00   | 0,00   | 0,00    | 0,00    |
|                                   | Solución amortiguadora     | 0,00   | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00   | 0,00   | 0,00    | 0,00    |
|                                   | MoCoV-MB                   | 459,00 | 1720,90 | 181,78  | 482,42  | 1158,17 | 3615,77 | 320,68 | 422,87 | 1045,20 | 1158,52 |

|                                         |                                   |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| PRNT <sub>50</sub><br>títulos<br>35 dpv | refuerzo de<br>MoCoV-MB           | 8162,55 | 385,26  | 5816,20 | 7429,67 | 0,00    | 1938,35 | 1530,96 | 1029,56 | 3286,57 | 3306,98 |
|                                         | MoCoV-MB-<br>M2-M3                | 68,84   | 137,79  | 87,75   | 365,22  | 107,91  | 378,70  | 157,64  | 97,45   | 175,16  | 124,65  |
|                                         | refuerzo de<br>MoCoV-MB-<br>M2-M3 | 507,68  | 2481,21 | 3132,03 | 3472,64 | 2069,10 | 1427,90 | 93,23   | 385,80  | 1696,20 | 1295,26 |
|                                         | Espícula                          | 0,00    | 762,88  | 2212,36 | 0,00    | 0,00    | 754,64  | 12,21   | 0,00    | 467,76  | 783,38  |
|                                         | Solución<br>amortiguadora         | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    | 0,00    |

**[379]** En conjunto, los títulos de anticuerpos de los ratones que recibieron la vacuna de MoCoV-MB o bien la vacuna de MoCoV-MB-M2-M3 mostraron la eficacia de las vacunas contra la variante sudafricana del SARS-CoV-2 en los ratones C57/BL6.

#### **6.7. Anticuerpos Neutralizantes contra Variantes del SARS-CoV-2 después de la Vacunación con Vacunas de MoCoV-MB o MoCoV-MB-M2-M3**

**[380]** Usando las muestras de sangre que se obtuvieron precedentemente en las secciones 6.5 y 6.6, se midieron los títulos de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 USA/PHC658/2021 (Linaje B.1.617.2; variante Delta) y SARS-CoV-2 aislado de un paciente colombiano (Linaje B.1.621, variante Mu), mediante una prueba de neutralización por reducción de focos de lisis.

**[381]** En este ensayo, las muestras de suero se inactivaron con calor mediante incubación a 56°C durante 30 minutos, se diluyeron en forma seriada al cuarto en 1X DMEM (dilución de trabajo en el rango entre 1:8 y 1:8192), se combinaron con un volumen igual de 800 UFP de SARS-CoV-2 (para diluciones finales de suero en el rango entre 1:16 y 1:16384), y se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usaron cincuenta µl por pocillo de esta mezcla de virus y suero para infectar placas sembradas con células Vero E6 a una confluencia de 90% y se incubaron durante 2 horas. Después de la incubación, se extrajo el inóculo de la placa, y se agregaron 150 µl de solución de sobre capa por pocillo (1X DMEM con 2% de carboximetil celulosa [CMC] y 2% de FBS) y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se descartó la sobrecapa entre 24 y 36 horas después de la infección y se agregaron 200 µL de solución amortiguadora de fijación (75% de acetona, 15% de metanol, 5% de ácido acético glacial y 5% de PBS) por pocillo y se

incubaron durante 15 min a -20°C. Se lavaron las placas hasta eliminar completamente la sobrecapa (entre 3 y 4 veces). Se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal humano [CR3022] contra la Glicoproteína de la Espícula de SARS-CoV-2 S1 - ABCAM ab273073 y Anticuerpo Neutralizante Anti-RBD de la Espícula de SARS-CoV-2, IgG1 Humana [AS35]- ACROBIOSYSTEMS) diluidos (1:2000) en solución amortiguadora de bloqueo (PBS-T [1X PBS+0,05% de Tween-20], leche en polvo al 5% y 5% de FBS) y se incubaron a 4°C durante una noche con agitación lenta constante. Después de lavar dos veces con PBS-T, se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario diluido (1:2000) (anticuerpo de cabra anti-IgG [H+L] de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación lenta constante. Se lavaron las placas dos veces con PBS-T y se agregaron 100 µL/pocillo de sustrato Cromógeno/Peróxido y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar durante una noche. Se escanearon las placas usando un lector de placas ELISPOT (ImmunoSPOT-Cellular Technology). Se contó el número de focos de replicación en las placas escaneadas y se calcularon los valores de PRNT50 usando el programa de computación Viridot (Katzelnick y col. 2018). Los gráficos se hicieron con el programa de computación GraphPad Prism.

**[382]** Se detectaron anticuerpos neutralizantes contra la variante Delta del SARS-CoV-2 (B.1.617.2) en ambas cepas de ratones (Tabla 6 y Tabla 7). Los grupos de K18-hACE-2 tratados mostraron mayores niveles de anticuerpos neutralizantes que los animales C57BL6J. Los niveles de anticuerpos neutralizantes contra la cepa delta fueron comparables a los obtenidos para la

cepa Washington. Los títulos también se incrementaron en los grupos tratados con refuerzo (FIGs. 8A-8B).

**Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50) contra la Cepa Delta de SAR-CoV-2 de muestras de suero de 35 días después de la vacunación de ratones C57BL6J vacunados.**

| Grupos                     | Animal |           |            |            |             |            |           |           | Medi<br>a  | SD         |
|----------------------------|--------|-----------|------------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|
|                            | 1      | 2         | 3          | 4          | 5           | 6          | 7         | 8         |            |            |
| MoCoV-MB                   | 23,72  | 32,0<br>7 | 0,00       | 21,05      | 13,62       | 101,5<br>5 | 11,2<br>3 | 15,6<br>1 | 27,36      | 31,43      |
| Refuerzo de MoCoV-MB       | 66,63  | 46,3<br>3 | 116,0<br>6 | 654,9<br>1 | 1043,3<br>6 | 120,8<br>2 | 67,8<br>9 | 0,00      | 264,5<br>0 | 377,4<br>1 |
| MoCoV-MB-M2-M3             | 0,00   | 0,00      | 0,00       | 16,81      | 0,00        | 79,73      | 0,00      | 0,00      | 12,07      | 27,97      |
| Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 16,11  | 92,7<br>4 | 173,5<br>9 | 209,2<br>4 | 12,23       | 33,18      | 0,00      | 0,00      | 67,14      | 82,78      |
| Espícula                   | 0,00   | 0,00      | 50,04      | 0,00       | 0,00        | 0,00       | 41,6<br>1 | 0,00      | 11,46      | 21,33      |
| Solución amortiguadora     | 0,00   | 0,00      | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00       | 0,00      | 0,00      | 0,00       | 0,00       |

**Tabla 7. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50) contra la Cepa Delta de SAR-CoV-2 de muestras de suero de 35 días después de la vacunación de ratones K18-hACE-2 vacunados.**

| Grupos   | Animales  |             |            |           |    |            |           |    |            |           | Med<br>ia  | SD         |
|----------|-----------|-------------|------------|-----------|----|------------|-----------|----|------------|-----------|------------|------------|
|          | 1         | 2           | 3          | 4         | 5  | 6          | 7         | 8  | 9          | 10        |            |            |
| MoCoV-MB | 180,<br>1 | 107<br>0,77 | 239,<br>68 | 530,<br>3 | NA | 424,<br>63 | 373,<br>7 | NA | 301<br>,02 | 254<br>,4 | 421,<br>83 | 285,<br>22 |

|                            |         |         |        |         |        |        |        |        |        |        |        |       |
|----------------------------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| refuerzo de                | 116     | 430     | 157    | 240     | 301    | 158    | 133    | 917    | 172    | 738    | 172    | 121   |
| MoCoV-MB                   | 2,7     | 7,9     | 5,89   | 2,16    | 8,93   | 5,37   | 3,59   | ,71    | ,59    | ,06    | 1,49   | 7,96  |
| MoCoV-MB-M2-M3             | 220,39  | 23,09   | 123,31 | 66,41   | 90,43  | 142,3  | 149,84 | 137,66 | 109,91 | 24,54  | 108,79 | 60,45 |
| refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 1156,74 | 1425,65 | 990,74 | 1903,76 | 160,41 | 277,55 | 282,75 | 750,81 | 196,34 | 243,42 | 738,82 | 611,2 |
| Solución amortiguadora     | 0       | 0       | 0      | 0       | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | -      | 0      | 0     |

[383] Los anticuerpos neutralizantes contra la variante Mu del SARS-CoV-2 (B.1.621) se detectaron para ambas cepas de ratones (Tabla 8 y Tabla 9). Los grupos K18-hACE-2 mostraron mayores niveles de anticuerpos neutralizantes que los animales C57BL6J. Los niveles de anticuerpos neutralizantes contra la cepa Mu fueron levemente inferiores a los obtenidos para la cepa Washington. Los títulos también se incrementaron en los grupos tratados con refuerzo (FIG. 9A-9B).

**Tabla 8. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50) contra la Cepa Mu del SAR-CoV-2 de muestras de suero de 35 días después de la vacunación de ratones C57BL6J vacunados.**

| Grupos               | Animal |        |       |         |         |       |        |       | Medi<br>a | SD      |
|----------------------|--------|--------|-------|---------|---------|-------|--------|-------|-----------|---------|
|                      | 1      | 2      | 3     | 4       | 5       | 6     | 7      | 8     |           |         |
| MoCoV-MB             | 97,64  | 12,98  | 0     | 51,23   | 27,33   | 0     | 9,94   | 13,82 | 26,62     | 33,16   |
| Refuerzo de MoCoV-MB | 487,56 | 166,55 | 66,31 | 3679,83 | 2395,09 | 75,68 | 498,56 | 60,73 | 928,79    | 1357,74 |

|                                   |      |      |      |       |      |     |      |     |      |       |
|-----------------------------------|------|------|------|-------|------|-----|------|-----|------|-------|
| <b>MoCoV-MB-M2-M3</b>             | 0    | 50,6 | 0    | 0     | 5,21 | 0   | 12,6 | 20, | 11,1 | 17,68 |
|                                   |      |      |      |       |      |     | 6    | 96  | 8    |       |
| <b>Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3</b> | 60,0 | 0    | 49,4 | 12,92 | 0    | 22, | 16,2 | 0   | 20,1 | 23,11 |
|                                   | 4    |      | 1    |       |      | 68  | 3    |     | 6    |       |
| <b>Espícula</b>                   | 6,19 | 0    | 381, | 25,72 | 36,7 | 30, | NA   | 53, | 76,2 | 135,7 |
|                                   |      |      | 38   |       |      | 41  |      | 57  | 8    | 4     |
| <b>Solución amortiguadora</b>     | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0   | 0    | 0   | 0    | 0     |

**Tabla 9. Títulos de anticuerpos neutralizantes (PRNT50) contra la Cepa Mu de SAR-CoV-2 de muestras de suero de 35 días después de la vacunación de ratones K18-Hace-2 Vacunados.**

| Grupos                            | Animal |      |     |      |      |     |      |      |     |     | Med<br>ia | SD   |
|-----------------------------------|--------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|-----|-----------|------|
|                                   | 1      | 2    | 3   | 4    | 5    | 6   | 7    | 8    | 9   | 10  |           |      |
| <b>MoCoV-MB</b>                   | 30,1   | 80,1 | 28, | 144, | 100, | 21, | 105, | 13,4 | 56, | 0,0 | 64,6      | 45,5 |
|                                   | 1      |      | 93  | 77   | 97   | 4   | 03   | 9    | 98  | 0   | 4         | 8    |
| <b>Refuerzo de MoCoV-MB</b>       | 607,   | 344, | 592 | 812, | 1639 | 51, | 157, | 38,0 | 60, | 53, | 435,      | 508, |
|                                   | 44     | 28   | ,4  | 13   | ,95  | 28  | 73   | 3    | 44  | 73  | 74        | 18   |
| <b>MoCoV-MB-M2-M3</b>             | 45,3   | 0,00 | 12, | 0,0  | 41,0 | 0,0 | 0,0  | 209, | 35, | 6,8 | 58,5      | 75,7 |
|                                   | 3      |      | 97  | 0    | 1    | 0   | 0    | 87   | 38  | 2   | 6         | 2    |
| <b>Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3</b> | 22,2   | 49,2 | 17, | 38,6 | 116, | 27, | 14,7 | 113, | 22, | 35, | 45,7      | 37,7 |
|                                   | 1      | 4    | 83  | 2    | 24   | 17  | 6    | 06   | 87  | 68  | 7         | 5    |
| <b>Solución amortiguadora</b>     | 0      | 0    | 0   | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0   | -   | 0         | 0    |

**[384]** Finalmente, estos datos demostraron que las vacunas indujeron títulos de anticuerpos comparables contra todas las cepas de SARS-CoV-2 evaluadas, con resultados similares a la cepa WA usada en el enfrentamiento. Todas las construcciones produjeron títulos de anticuerpos neutralizantes contra las cepas Delta y Mu. Por lo tanto, se espera que las vacunas también confieran protección contra estas cepas.

#### **6.8. Carga de ARN Viral de SARS-CoV-2 Después de la Vacunación con Vacunas de MoCoV-MB o MoCoV-MB-M2-M3**

**[385]** Usando las muestras de pulmón que se obtuvieron después de la eutanasia de los animales en las secciones 6.5 y 6.6 previas, se extrajo el ARN de las muestras de pulmón homogeneizadas en 1 mL de Trizol usando un kit Direct-zol™ RNA Miniprep Plus de Zymo Research siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se mezclaron 350 µL de la muestra de tejido homogeneizado en TRIzol® con un volumen igual de etanol de grado para biología molecular entre 95 y 100%, se homogeneizaron con vórtex y se transfirieron a una columna de sílice para proceder a la purificación de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del eluato de ARN se cuantificó usando un NanoDrop 1000 y se evaluó su calidad mediante los índices de pureza 260/280 y 260/230, los que deber estar entre 1,8 y 2,0 y entre 1,8 y 2,2, respectivamente. Las muestras que presentaban concentraciones muy bajas (<70 ng/µL) o impurezas se procesaron nuevamente. Se diluyeron las muestras de ARN a una concentración de 100 ng/reacción de PCR. En los casos en que la concentración inicial de la muestra era muy baja y cuando no era posible obtener esta concentración, se usaron 8,5 µL del eluato y la concentración de ARN en la reacción de PCR se calculó en forma individual.

**[386]** La carga de ARN viral se cuantificó usando análisis por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) con curva estándar. Se usó el iTaq One-Step Universal Probes Kit de Bio-rad y los cebadores y sondas del 2019-nCoV RUO Kit de Integrated DNA Technologies. Este kit de RT-qPCR se basa en las recomendaciones de CDC-USA e identifica al gen específico N del SARS-CoV-2. Se usaron 8,5 µL de ARN de cada muestra para un volumen final de reacción de 20 µL en el instrumento de ciclado térmico iCycler (Bio-Rad). Se llevó a cabo un ciclo inicial de 10 minutos a 50°C para la transcripción reversa, seguido por una activación de la polimerasa de 3 minutos a 95°C, luego, se hicieron 45 ciclos de PCR con una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 55°C para la hibridización de los cebadores, elongación y pasos de lectura. Se incluyó un control negativo NTC (control sin molde) y 8 estándares en la prueba para llevar a cabo la calibración o curva estándar.

**[387]** Para las titulaciones de los virus, también se realizó un ensayo de formación de focos de lisis. Se homogeneizaron las muestras de pulmón en DMEM suplementado con 2% de Suero Fetal Bovino (FBS) usando un batidor de esferas, y luego se diluyeron en forma seriada (al décimo) (entre sin diluir y 1:100.000) por duplicado. Se usó un volumen de 50 µL de estas diluciones para infectar placas de 96 pocillos sembradas con células Vero E6. Se incubaron las placas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>) durante 1 hora. Luego, se agregó una solución de sobrecapa (DMEM 1x con 2% de carboximetil celulosa y 2% de FBS) y se incubaron durante 24 horas. Se eliminó la sobrecapa y se agregaron 200 µL por pocillo de solución amortiguadora de fijación de acetona-metanol (75% de acetona + 15% de metanol + 5% de ácido acético glacial + 5% de PBS) y se

incubaron durante 15 minutos a -20°C. Se lavaron las placas hasta eliminar completamente la sobrecapa (entre 3 y 4 veces). Se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal humano [CR3022] contra la Glicoproteína de la Espícula de SARS-CoV-2 S1 - ABCAM ab273073) diluido (1:2000) en solución amortiguadora de bloqueo y se incubó durante una noche a 4°C con agitación lenta constante. Después de lavar dos veces con PBS-T, se agregaron 100 µL/pocillo de anticuerpo secundario diluido (1:2000) (anticuerpo de cabra anti-IgG [H+L] de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante) y se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación lenta constante. Se lavaron las placas dos veces con PBS-T y se agregaron 100 µL/pocillo de sustrato Cromógeno/Peróxido y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar durante una noche. Se escanearon las placas usando un lector de placas ELISPOT (ImmunoSPOT-Cellular Technology) y se contó el número de focos de replicación en las placas escaneadas usando el programa de computación Viridot y se calcularon los títulos virales.

**[388]** En la Tabla 10 se muestran los resultados de PCR para los animales C57BL6J. Se observó amplificación del ARN de SARS-CoV-2 para todos los grupos. El grupo tratado con la solución amortiguadora mostró una concentración de ARN levemente superior en comparación con los otros grupos. Sin embargo, solo el grupo tratado con refuerzo de MB fue estadísticamente diferente al grupo tratado con la solución amortiguadora, todos los otros grupos no mostraron diferencias (FIG. 10A). El candidato vacunal MB-2-3 presentó concentraciones de ARN de SARS-CoV-2 similares al grupo tratado con la solución amortiguadora, siendo esto consistente con los resultados de las PRNT,

en donde este grupo tuvo el título de anticuerpos neutralizantes más bajo en comparación con los otros grupos.

**Tabla 10. Resultados de la Cuantificación de ARN y RT-qPCR de pulmones de ratones C57BL6J vacunados.**

| Grupo                | Código de ID | Peso de Tejido (g) | Concentración de ARN (ng/μl) | Ciclo umbral (Ct) | Copias de SARS-CoV-2/μL | Copias de SARS-CoV-2/g |
|----------------------|--------------|--------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| MoCoV-MB             | 311          | 0,06               | 685,67                       | 31,7              | 28,50                   | 1116662,57             |
|                      | 312          | 0,07               | 212,24                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 313          | 0,04               | 542,66                       | 24,94             | 2550,00                 | 1,19E+08               |
|                      | 314          | 0,05               | 881,95                       | 38,39             | 0,33                    | 2,00E+08               |
|                      | 315          | 0,09               | 118,84                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 316          | 0,06               | 197,85                       | 37,15             | 0,76                    | 1,08E+08               |
|                      | 317          | 0,05               | 263,00                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 318          | 0,03               | 270,1                        | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
| Refuerzo de MoCoV-MB | 319          | 0,03               | 304,65                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 320          | 0,04               | 226,74                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 321          | 0,03               | 199,59                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 322          | 0,06               | 220,21                       | 39,7              | 0,14                    | 1,97E+08               |
|                      | 323          | 0,05               | 286,89                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 324          | 0,04               | 152,85                       | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 325          | 0,06               | 281,7                        | 0,00              | 0,00                    | 0,00                   |
|                      | 326          | 0,05               | 265,27                       | 32,65             | 15,10                   | 2,75E+08               |
| MoCoV-MB-            | 327          | 0,05               | 387,13                       | 23,25             | 7900,00                 | 2,10E+08               |
| M2-M3                | 328          | 0,02               | 464,66                       | 21,84             | 20200,00                | 1,61E+09               |

|                                        |     |      |        |       |          |            |
|----------------------------------------|-----|------|--------|-------|----------|------------|
|                                        | 329 | 0,05 | 695,7  | 27,73 | 400,00   | 19082057,1 |
|                                        | 330 | 0,03 | 448,72 | 32,02 | 23,10    | 1184620,8  |
|                                        | 331 | 0,04 | 657,46 | 22,65 | 11800,00 | 6,65E+08   |
|                                        | 332 | 0,06 | 115,38 | 25,27 | 2050,00  | 29285714,3 |
|                                        | 333 | 0,05 | 224,45 | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
|                                        | 334 | 0,05 | 291,63 | 25,18 | 2180,00  | 43594518,9 |
| Refuerzo de<br>MoCoV-MB-<br>M2-M3      | 335 | 0,04 | 305,77 | 37,23 | 0,72     | 1,88E+08   |
|                                        | 336 | 0,03 | 409,61 | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
|                                        | 337 | 0,08 | 332,65 | 35,15 | 2,86     | 4,08E+08   |
|                                        | 338 | 0,03 | 421,49 | 31,76 | 27,30    | 1315048,8  |
|                                        | 339 | 0,06 | 377,13 | 26,15 | 1140,00  | 24567325,7 |
|                                        | 340 | 0,1  | 614,31 | 30,55 | 61,10    | 1286891,69 |
|                                        | 341 | 0,04 | 218,99 | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
|                                        | 342 | 0,06 | 124,8  | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
| Proteína de la<br>Espícula -GLA        | 343 | 0,07 | 84,06  | 31,96 | 23,90    | 2,93E+08   |
|                                        | 344 | 0,03 | 71,96  | 31,41 | 34,50    | 9,86E+08   |
|                                        | 345 | 0,09 | 110,29 | 37,32 | 0,68     | 6,44E+08   |
|                                        | 346 | 0,05 | 210,66 | 34,84 | 3,51     | 6,02E+08   |
|                                        | 347 | 0,07 | 217,64 | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
|                                        | 348 | 0,03 | 175,58 | 31,8  | 26,60    | 7,60E+05   |
|                                        | 350 | 0,05 | 80,69  | 0,00  | 0,00     | 0,00       |
| Solución<br>amortiguadora<br>(Control) | 352 | 0,1  | 215,81 | 22,55 | 12500,00 | 1,07E+08   |
|                                        | 353 | 0,05 | 165,75 | 19,67 | 85300,00 | 1,46E+09   |
|                                        | 354 | 0,04 | 727,52 | 25,54 | 1720,00  | 1,07E+08   |
|                                        | 355 | 0,08 | 85,28  | 0,00  | 0,00     | 0,00       |

|  |     |      |        |       |           |          |
|--|-----|------|--------|-------|-----------|----------|
|  | 356 | 0,05 | 553,57 | 16,22 | 851000,00 | 3,23E+14 |
|  | 357 | 0,06 | 83,77  | 18,19 | 229000,00 | 3,27E+09 |
|  | 358 | 0,07 | 48,43  | 0,00  | 0,00      | 0,00     |
|  | 359 | 0,05 | 562,21 | 34,21 | 5,35      | 2,06E+08 |

**[389]** En la Tabla 11 se muestran los resultados de PCR para los ratones K18-hACE-2. Se observó amplificación del ARN de SARS-CoV-2 para todos los grupos; sin embargo, se observó una amplificación más temprana en el grupo tratado con la solución amortiguadora, siendo este estadísticamente diferente a todos los otros grupos (FIG. 10B).

**Tabla 11. Resultados de la Cuantificación de ARN y RT-qPCR de pulmones de ratones K18-hACE-2 vacunados.**

| Grupo    | Código de ID | Peso de Tejido (g) | Concentración de ARN (ng/μl) | Ciclo umbral (Ct) | Copias de SARS-CoV-2/μL | Copias de SARS-CoV-2/g |
|----------|--------------|--------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| MoCoV-MB | 381          | 0,09               | 418,65                       | 38,85             | 2,25E-01                | 358,842,857            |
|          | 382          | 0,08               | 224,59                       | N/A               | 0                       | 0                      |
|          | 383          | 0,03               | 164,48                       | 30,75             | 4,96E+01                | 1417142,86             |
|          | 384          | 0,07               | 248,5                        | 29,59             | 1,08E+02                | 1314514,29             |
|          | 385          | 0,07               | 187,72                       | 23                | 8,72E+03                | 106775510              |
|          | 386          | 0,07               | 4,09                         | 36,35             | 1,19E+00                | 145,714,286            |
|          | 387          | 0,07               | 64,82                        | 32,61             | 1,44E+01                | 176,326,531            |
|          | 388          | 0,08               | 90,56                        | 27,55             | 4,19E+02                | 4489285,71             |

|                                |     |      |        |       |          |             |
|--------------------------------|-----|------|--------|-------|----------|-------------|
|                                | 389 | 0,05 | 392,99 | 29,8  | 9,39E+01 | 2530406,47  |
|                                | 390 | 0,08 | 139,48 | 27,29 | 4,99E+02 | 5346428,57  |
| SOLUCIÓN<br>AMORTIGUADORA      | 391 | 0,07 | 108,59 | N/A   | 0        | 0           |
|                                | 392 | 0,03 | 201,93 | 25,04 | 2,25E+03 | 64285714,3  |
|                                | 393 | 0,11 | 49,29  | 13,06 | 6,56E+06 | 5,11E+14    |
|                                | 394 | 0,08 | 25,7   | 15,03 | 1,77E+06 | 1,90E+14    |
|                                | 395 | 0,1  | 386,95 | 13,19 | 6,02E+06 | 7,99E+14    |
|                                | 396 | 0,11 | 18,72  | 13,96 | 3,62E+06 | 2,82E+14    |
|                                | 397 | 0,15 | 318,67 | 12,47 | 9,75E+06 | 7,10E+14    |
|                                | 398 | 0,04 | 142,78 | 11,14 | 2,36E+07 | 5,06E+15    |
|                                | 399 | 0,08 | 809,58 | 12,17 | 1,19E+07 | 4,13E+15    |
| Refuerzo de MoCoV-<br>MB       | 401 | 0,06 | 81,62  | 37,48 | 5,59E-01 | 798,571,429 |
|                                | 402 | 0,06 | 15,65  | 33,9  | 6,09E+00 | 87000       |
|                                | 403 | 0,11 | 222,86 | 26,83 | 6,78E+02 | 5283116,88  |
|                                | 404 | 0,02 | 243,04 | 38,98 | 2,06E-01 | 882,857,143 |
|                                | 405 | 0,03 | 142,28 | 31,73 | 2,59E+01 | 740000      |
|                                | 406 | 0,06 | 114,8  | 30,7  | 5,13E+01 | 732,857,143 |
|                                | 407 | 0,13 | 332,08 | N/A   | 0        | 0           |
|                                | 408 | 0,03 | 204,3  | 37,15 | 6,96E-01 | 198,857,143 |
|                                | 409 | 0,04 | 181,82 | 34,58 | 3,87E+00 | 829,285,714 |
|                                | 410 | 0,11 | 13,02  | N/A   | 0        | 0           |
| Refuerzo de MoCoV-<br>MB-M2-M3 | 411 | 0,03 | 133,91 | 33,14 | 1,01E+01 | 288,571,429 |
|                                | 412 | 0,03 | 382,2  | N/A   | 0        | 0           |
|                                | 413 | 0,05 | 649,96 | N/A   | 0        | 0           |
|                                | 414 | 0,04 | 798    | N/A   | 0        | 0           |

|                |     |      |        |       |          |             |
|----------------|-----|------|--------|-------|----------|-------------|
|                | 415 | 0,05 | 311,35 | N/A   | 0        | 0           |
|                | 416 | 0,06 | 462,71 | 29,56 | 1,10E+02 | 2908462,86  |
|                | 417 | 0,04 | 879,9  | 35,21 | 2,54E+00 | 191566,8    |
|                | 418 | 0,04 | 409,51 | 31,39 | 3,25E+01 | 1140777,86  |
|                | 419 | 0,06 | 22,6   | 30,82 | 4,76E+01 | 680000      |
|                | 420 | 0,03 | 159,06 | 39,6  | 1,36E-01 | 388,571,429 |
| MoCoV-MB-M2-M3 | 421 | 0,07 | 307,55 | 34,5  | 4,10E+00 | 617,610,612 |
|                | 422 | 0,06 | 248,39 | N/A   | 0        | 0           |
|                | 423 | 0,03 | 215,61 | 34,42 | 4,31E+00 | 123,142,857 |
|                | 424 | 0,04 | 264    | 38,57 | 2,70E-01 | 610,971,429 |
|                | 425 | 0,05 | 231,5  | 34,01 | 5,67E+00 | 97200       |
|                | 426 | 0,04 | 216,09 | 27,34 | 4,83E+02 | 10350000    |
|                | 427 | 0,1  | 246,01 | 27,11 | 5,62E+02 | 4817142,86  |
|                | 429 | 0,07 | 307,85 | 30,32 | 6,63E+01 | 999,695,755 |
|                | 430 | 0,04 | 250,91 | 34,7  | 3,59E+00 | 772,085,914 |
|                | 431 | 0,04 | 581,83 | 31,5  | 3,02E+01 | 1506108,51  |

**[390]** El ARN del SARS-CoV-2 aún se detectó en todas las muestras de pulmón, sin embargo, el valor de copias de ARN por gramo para los animales vacunados fue menor que en los animales del grupo tratado con la solución amortiguadora. Esto también se observó al evaluar la presencia de partículas infecciosas vivas de SARS-CoV-2 en los tejidos recolectados mediante ensayo de titulación por formación de focos de lisis, mostrando muy bajos títulos en comparación con el grupo tratado con la solución amortiguadora, lo que sugiere que los animales fueron capaces de eliminar en forma exitosa la infección al final del estudio.

### 6.9. Medida del título viral mediante ensayo de formación de focos de lisis

[391] Se detectaron títulos de SARS-CoV-2 infeccioso en los pulmones medidos a través del ensayo de formación de focos de lisis en todos los animales (Tabla 12 y Tabla 13). Los títulos fueron similares para todos los animales vacunados en los ratones C57BL6 y K18-hACE-2, presentado una reducción significativa de los títulos virales, en contraste con los títulos más altos del grupo tratado con la solución amortiguadora (FIG. 11A-11B).

**Tabla 12. Títulos SARS-CoV-2 infecciosos (FFU/g) en los pulmones de los ratones C57BL6J vacunados medidos a través del ensayo de formación de focos de lisis.**

| Animal       | Grupos        |                      |                |                            |               |                        |
|--------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------------|---------------|------------------------|
|              | MoCoV-MB      | Refuerzo de MoCoV-MB | MoCoV-MB-M2-M3 | Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | Espícula      | Solución amortiguadora |
| 1            | 0,00          | 0,00                 | 0,00           | 0,00                       | 750,00        | 5800,00                |
| 2            | 0,00          | 400,00               | 250,00         | 0,00                       | 0,00          | 3333,33                |
| 3            | 0,00          | 1000,00              | 0,00           | 0,00                       | 0,00          | 4428,57                |
| 4            | 500,00        | 200,00               | 22333,33       | 0,00                       | 428,57        | 1333,33                |
| 5            | 31,25         | 1600,00              | 200,00         | 0,00                       | 1666,67       | 2750,00                |
| 6            | 2000,00       | 1000,00              | 0,00           | 0,00                       | 0,00          | 3250,00                |
| 7            | 0,00          | 0,00                 | 400,00         | 666,67                     | 800,00        | 1428,57                |
| 8            | 0,00          | 0,00                 | 0,00           | 200,00                     | NA            | 6333,33                |
| <b>Media</b> | <b>316,41</b> | <b>525,00</b>        | <b>2897,92</b> | <b>108,33</b>              | <b>520,75</b> | <b>3582,14</b>         |
| <b>SD</b>    | <b>702,05</b> | <b>604,15</b>        | <b>7854,54</b> | <b>236,21</b>              | <b>614,51</b> | <b>1842,52</b>         |

**Tabla 13. Títulos de SARS-CoV-2 infeccioso (FFU/g) en los pulmones de los ratones K18-hACE-2 vacunados medidos a través del ensayo de formación de focos de lisis.**

| Animal       | Grupos         |                      |                |                            |                        |
|--------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------------|------------------------|
|              | MoCoV-MB       | Refuerzo de MoCoV-MB | MoCoV-MB-M2-M3 | Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | Solución amortiguadora |
| 1            | 1833,33        | 500,00               | 4666,67        | 1750,00                    | 64666,67               |
| 2            | 100,00         | 375,00               | 1400,00        | 9333,33                    | 12000,00               |
| 3            | 142,86         | 285,71               | 875,00         | 6000,00                    | 43500,00               |
| 4            | 166,67         | 3000,00              | 142,86         | 2142,86                    | 9333,33                |
| 5            | 500,00         | 250,00               | 428,57         | 166,67                     | 22600,00               |
| 6            | 0,00           | 1000,00              | 200,00         | 3250,00                    | 20000,00               |
| 7            | 11000,00       | 1428,57              | 0,00           | 1750,00                    | 5857,14                |
| 8            | 2250,00        | 1000,00              | 166,67         | 0,00                       | 3142,86                |
| 9            | 1500,00        | 600,00               | 555,56         | 500,00                     | 18857,14               |
| 10           | 166,67         | 2000,00              | 0,00           | 2666,67                    | -                      |
| <b>Media</b> | <b>1765,95</b> | <b>1043,93</b>       | <b>843,53</b>  | <b>2755,95</b>             | <b>22217,46</b>        |
| <b>SD</b>    | <b>3347,03</b> | <b>884,29</b>        | <b>1412,97</b> | <b>2902,62</b>             | <b>19915,87</b>        |

#### **6.10. Cambios Histopatológicos Después de la Vacunación con Vacunas de MoCoV-MB o MoCoV-MB-M2-M3**

**[392]** Se aislaron los tejidos de los animales como se describió precedentemente en las secciones 6.5 y 6.6. Los tejidos conservados en 10% de

formalina amortiguada a pH neutro se enviaron al Departamento de Histopatología en UW-Madison para la preparación de cortes para Hematoxilina y Eosina (H&E). Luego, se cometieron los cortes a análisis histopatológico. Todos los cambios se graduaron de acuerdo con su severidad entre 0 (sin lesiones) y 4 (lesión severa) o con la distribución de las lesiones entre 0 (sin lesiones) y 4 (lesiones numerosas).

**[393]** En las Tablas 14 y 15 se muestran las puntuaciones que se asignaron a las diferentes lesiones, en base a la revisión de la literatura y a los hallazgos comunes en animales y humanos para las infecciones por SARS-CoV-2.

**Tabla 14. Puntuaciones de cambios histopatológicos en tejidos de ratones C57BL6J vacunados.**

| Grupo                | ID  | Área general afectada | Severidad de inflamación | Acumulación macrófagos alveolares | Inflamación intersticial linfoplasmacítica-neutrófila | Edema intersticial | Hemorragia alveolar | Hipertrofia/hiperplasia de epitelio bronquial/bronquiolar | Hipertrofia/hiperplasia de neumocitos de tipo II | Infiltrado inflamatorio peribronquial peribronquiolar | Transmisión bronquial e infiltración bronquial (linfocitos neutrófilos) | Infiltrado inflamatorio perivascular | Transmisión de neutrófilos y linfocitos vasculares | Necrosis de epitelio bronquial/bronquiolar |
|----------------------|-----|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| MoCoV-MB             | 311 | 2                     | 2                        | 0                                 | 1                                                     | 1                  | 0                   | 2                                                         | 1                                                | 2                                                     | 1                                                                       | 2                                    | 1                                                  | 0                                          |
|                      | 312 | 1                     | 1                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 1                                                | 1                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 313 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 1                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 314 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 315 | 2                     | 1                        | 0                                 | 1                                                     | 1                  | 0                   | 2                                                         | 1                                                | 2                                                     | 1                                                                       | 1                                    | 1                                                  | 0                                          |
|                      | 316 | 2                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 2                                                     | 1                                                                       | 2                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 317 | 2                     | 2                        | 1                                 | 1                                                     | 1                  | 0                   | 2                                                         | 2                                                | 2                                                     | 1                                                                       | 2                                    | 1                                                  | 0                                          |
|                      | 318 | 1                     | 1                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 1                                    | 1                                                  | 0                                          |
|                      | 319 | 1                     | 1                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 1                                                     |                                                                         | 2                                    | 1                                                  | 0                                          |
| Refuerzo de MoCoV-MB | 320 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 322 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |
|                      | 323 | 1                     | 1                        | 1                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 1                                                | 0                                                     | 0                                                                       | 0                                    | 0                                                  | 0                                          |

|                            |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                            | 324 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                            | 325 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
|                            | 326 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| MoCoV-MB-M2-M3             | 327 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                            | 328 | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 0 |
|                            | 329 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
|                            | 330 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 |
|                            | 331 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                            | 332 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 |
|                            | 333 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                            | 334 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3 | 335 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                            | 336 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
|                            | 337 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 0 |
|                            | 338 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 |
|                            | 339 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                            | 340 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 |

|                        |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                        | 341 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                        | 342 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| Espícula               | 343 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
|                        | 344 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
|                        | 345 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 |
|                        | 346 | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                        | 347 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0 |
|                        | 348 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                        | 350 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Solución amortiguadora | 352 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                        | 353 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
|                        | 354 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                        | 355 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                        | 356 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                        | 357 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                        | 358 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                        | 359 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

**Tabla 15. Puntuaciones de cambios histopatológicos en tejidos de ratones K18-hACE-2 vacunados.**

| Grupo              | ID  | Área general afectada | Severidad de inflamación | Acumulación macrófagos alveolares | Inflamación intersticial linfoplasmática-neutrofílica | Edema intersticial | Hemorragia alveolar | Hipertrofia/hiperplasia de epitelio bronquial/bronquiolar | Hipertrofia/hiperplasia de neumocitos de tipo II | Infiltrado inflamatorio peribronquial peribronquiolar | Transmigración bronquial e infiltración bronquial (linfocitos neutrófilos) | Infiltrado inflamatorio perivascular | Transmigración de neutrófilos y linfocitos vasculares | Necrosis de epitelio bronquial/bronquiolar |
|--------------------|-----|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| MoCoV-MB           | 381 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                          | 0                                    | 0                                                     | 0                                          |
|                    | 382 | 1                     | 0                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                          | 0                                    | 0                                                     | 0                                          |
|                    | 383 | 1                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                          | 2                                    | 2                                                     | 0                                          |
|                    | 384 | 1                     | 1                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 1                                                | 1                                                     | 0                                                                          | 1                                    | 1                                                     | 0                                          |
|                    | 385 | 1                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                          | 3                                    | 1                                                     | 0                                          |
|                    | 386 | 1                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 1                                                         | 0                                                | 0                                                     | 0                                                                          | 2                                    | 2                                                     | 0                                          |
|                    | 387 | 1                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 1                                                | 1                                                     | 0                                                                          | 2                                    | 0                                                     | 1                                          |
|                    | 388 | 2                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 1                                                     | 0                                                                          | 2                                    | 0                                                     | 1                                          |
|                    | 389 | 2                     | 2                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 2                                                     | 0                                                                          | 3                                    | 1                                                     | 0                                          |
|                    | 390 | 2                     | 3                        | 2                                 | 2                                                     | 0                  | 0                   | 3                                                         | 0                                                | 2                                                     | 0                                                                          | 3                                    | 2                                                     | 0                                          |
| Refuerzo de MoCoV- | 401 | 1                     | 1                        | 0                                 | 0                                                     | 0                  | 0                   | 2                                                         | 0                                                | 1                                                     | 0                                                                          | 2                                    | 2                                                     | 0                                          |
|                    | 402 | 2                     | 2                        | 1                                 | 2                                                     | 2                  | 0                   | 2                                                         | 2                                                | 2                                                     | 1                                                                          | 2                                    | 1                                                     | 0                                          |

|                |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                | 403 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
|                | 404 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 405 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                | 406 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 407 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                | 408 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                | 409 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 410 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| MoCoV-MB-M2-M3 | 421 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 422 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 423 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                | 424 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                | 425 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                | 426 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
|                | 427 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                | 429 | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 | 3 | 1 | 0 |
|                | 430 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |

|                                                 |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                                 | 431 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| Refuerzo de MoCoV-MB-M2-M3                      | 411 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                                                 | 412 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
|                                                 | 413 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 0 | 0 |
|                                                 | 414 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
|                                                 | 415 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                                                 | 416 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 |
|                                                 | 417 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
|                                                 | 418 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 0 |
|                                                 | 419 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |
|                                                 | 420 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SOLUCIÓN<br>AMORTIGUADORA<br>(Control negativo) | 391 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
|                                                 | 392 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                                                 | 393 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
|                                                 | 394 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|                                                 | 395 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 |
|                                                 | 396 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

|  |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|  | 397 | 3 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 |
|  | 398 | 2 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 3 |
|  | 399 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |

[394] En general, todos los grupos presentaron puntuaciones similares para cada lesión. Las lesiones se centraron en los bronquios, bronquios terminales, zona perivascular y vascular, con infiltración linfoplasmacítica y linfoplasmacítica-neutrofílica mixta e hiperplasia de epitelio bronquiolar. En forma ocasional, hubo cambios vasculares segmentales a globales (daño endotelial y exudación de proteínas plasmáticas, especialmente fibrina). Hubo unos pocos sujetos que tuvieron histiocitosis alveolar y se identificaron unas pocas células gigantes multinucleadas (macrófagos) vs células sinciciales multinucleadas virales. No hubo lesiones significativas identificadas en corazón, riñón, y glándulas adrenales de las secciones de tejido examinadas.

[395] El daño en los tejidos se localizó principalmente en los tejidos pulmonares. No se identificaron lesiones significativas en corazón o riñón. No hubo reducción de las lesiones en los animales vacunados en comparación con las puntuaciones del grupo control tratado con la solución amortiguadora.

#### **6.11. Análisis de eficacia de MoCoV en un modelo de mono cinomolgo**

[396] Se generó un vector para vacunas basado en MoCoV como se describió precedentemente en las secciones 6.1 y 6.2. En el día 0 del experimento, a tres grupos de monos cinomolgos se administra la vacuna o el placebo. El grupo 1 (N=5) y el grupo 2 (N=5) reciben la administración de  $1 \times 10^8$  UFP de la vacuna de MoCoV, y el grupo 3 recibe la administración de  $1 \times 10^8$  UFP del MVA parental (FIG. 12A). En el día 21 del experimento, el grupo 2 recibe la administración de otras  $1 \times 10^8$  UFP de la vacuna de MoCoV. Se analiza el suero a los días 21 y 35 para cada grupo mediante pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (FIG. 12B). Se administra a ratones K18-hECA2 el suero de primate no humano seguido por enfrentamiento intranasal con SARS-CoV-2. Las muestras

de suero recolectadas a las cinco semanas después de la primera dosis se titulan y se prepara un agrupamiento mixto y se inyectan por vía intraperitoneal en el modelo de ratón K18-hECA2. A las doce horas después de la transferencia pasiva, se enfrenta a los ratones por vía intranasal con SARS-CoV-2.

**[397]** Además, los monos cinomolgos de cada grupo se enfrentan luego con la variante Wuhan del SARS-CoV-2 y se pesan en forma diaria para medir la pérdida de peso a lo largo del tiempo en los diferentes grupos. Finalmente, se miden las tasas de supervivencia en cada grupo después del enfrentamiento con la variante Wuhan del SARS-CoV-2.

#### **6.12. Vacunas basadas en el ARNm de MoCoV**

**[398]** Las tres secuencias mosaicos M2, M3, y MB que se generaron en el ejemplo 6.2 anterior, se usan para generar el vector para vacunas basado en MoCoV mRNA-MoCoV-MB-M2-M3.

**[399]** El vector para vacunas basado en MoCoV se carga en un sistema de administración mediante nanopartículas lipídicas desarrollado para administrar en forma eficaz y segura ácidos nucleicos terapéuticos al citosol de diversos tipos celulares después de la administración local *in vivo*.

**[400]** Se llevan a cabo experimentos preclínicos para probar la eficacia de la vacuna de mRNA-MoCoV-MB-M2-M3. En el día 0 del experimento, seis grupos de ocho ratones C57/BL6 (cuatro semanas de edad) reciben la administración de la vacuna o el placebo a través de inyección intramuscular. El grupo 1 y el grupo 2 reciben la administración de la vacuna de mRNA-MoCoV-MB-M2-M3, el grupo 3 recibe la administración de  $10^8$  UFP de la proteína de la espícula de SARS-CoV-2 como control positivo, y el grupo 6 recibe la administración de un placebo como control negativo. En el día 21 del experimento, el grupo 2 recibe

la administración de otra dosis de la vacuna de mRNA-MoCoV-MB-M2-M3, y el grupo 5 recibe la administración de otras  $1 \times 10^8$  UFP de la Proteína de la Espícula del SARS-CoV-2. En el día 35 del experimento, los cinco grupos se enfrentan con  $6 \times 10^4$  UFP de SARS-CoV-2 por administración intranasal. Cinco días después del enfrentamiento, se sacrifican los ratones.

**[401]** La actividad de los anticuerpos se analiza mediante pruebas de neutralización por reducción de placas de lisis (PRNT). Se obtienen muestras de suero de cada ratón 21 días después de la vacunación y 35 días después de la vacunación. Las muestras de suero se mezclan con una cantidad conocida de suspensión de virus y se inoculan *in vitro*. Se mide la reducción de las placas de lisis para cada grupo para determinar la actividad de los anticuerpos en las muestras de suero. Se analizan los pulmones de los ratones para ver la carga viral. Además, se analiza la histopatología de los ratones por tinción con hematoxilina y eosina.

### **6.13. Caracterización de la Construcción MoCoV-M4**

**[402]** Se analizó la construcción MVA-MoCoV-M4 como se describe en el ejemplo 6.1 como candidato para una vacuna universal contra el coronavirus.

#### *Expresión In vitro*

**[403]** Se determinó la expresión *in vitro* de MVA-MoCoV-M4 por análisis de inmunotransferencia. Se plaquearon células DF-1 en placas de 6 pocillos y se infectaron con virus MVA-MoCoV-M4 a una MOI de 5. A las 24 horas después de la infección, se cosecharon las células infectadas en presencia de una solución amortiguadora de lisis, se centrifugaron y concentraron por ultrafiltración. Luego se combinaron los sobrenadantes con un volumen igual de 2X solución amortiguadora de siembra y se calentaron a 95°C durante 5 minutos.

Se separaron las muestras de sobrenadante y de células por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para análisis por transferencia Western usando suero policlonal humano anti-SARS-CoV-2. En la Figura 13 se muestran los resultados de la expresión *in vitro*. Se identificó una banda de aproximadamente 180 kDa en los extractos de las células infectadas con MVA-MoCoV-M4.

#### *Inmunización y Enfrentamiento*

**[404]** Se evaluó la inmunogenicidad y la eficacia de las construcciones MVA-MoCoV-M4 y MVA-MoCoV-MB-M2-M3 en ratones. Grupos de ratones transgénicos K18-hECA2 hembra de entre 4 y 6 semanas de edad recibieron inmunizaciones primarias y de refuerzo con cada candidato vacunal a través de rutas intranasal, oral o intramuscular con una dosis de  $5 \times 10^7$  UFP (Tabla 16). Un grupo control se inmunizó con vector MVA vacío. A las dos semanas después del refuerzo, se enfrentó a todos los grupos con el SARS-CoV-2 (variante Beta). Después de la inoculación, se monitorearon los animales durante 10 días, y se registraron las mortalidad y la pérdida de peso.

**Tabla 16 – Diseño experimental preclínico**

| Grupo | n | Vacuna | Ruta | Dosis (PFU) por ruta IM | Sensibilización (28 dpv) | Refuerzo 42 dpv | Enfrentamiento con SARS-CoV-2 / 56 dpv / Dosis (PFU) |
|-------|---|--------|------|-------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|
| 1     | 8 |        | IN   | $5 \times 10^7$         | Sí                       | Sí              | $5 \times 10^4$                                      |

|          |   |               |      |                   |    |    |                    |
|----------|---|---------------|------|-------------------|----|----|--------------------|
| <b>2</b> | 7 | MVA-MoCo      | IM   | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |
| <b>3</b> | 7 | V-M4          | Oral | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |
| <b>4</b> | 6 | MVA-MoCoV     | IN   | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |
| <b>5</b> | 6 | -MB-2-        | Oral | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |
| <b>6</b> | 7 | 3             | IM   | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |
| <b>7</b> | 5 | Control (MVA) | IM   | 5x10 <sup>7</sup> | Sí | Sí | 5 x10 <sup>4</sup> |

**[405]** Como se muestra en la figura 14, el candidato vacunal MVA-MoCoV-M4 administrado por rutas intranasal e intramuscular proporcionó una mejor protección contra la pérdida de peso en comparación con el MVA-MoCoV-MB-M2-M3. Por el contrario, los animales control y los vacunados por vía oral tuvieron una pérdida de peso significativa.

**[406]** Además, los animales vacunados con la construcción MVA-MoCoV-M4 (intranasal, intramuscular) y MVA-MoCoV-MB-M2-M3 (intramuscular) tuvieron 100% de supervivencia después del enfrentamiento letal con la variante Beta de SARS-CoV-2 (Figura 15).

#### **6.14. Reactividad Cruzada con MERS (Predictivo)**

**[407]** Las construcciones de MoCoV de la presente solicitud tienen una respuesta inmunológica protectora de reacción cruzada contra el MERS. Las construcciones se pueden usar por lo tanto para la inmunización contra el MERS

usando las mismas formulaciones, dosificaciones y rutas que las que se describen en la presente para el SARS-CoV-2 y todas sus variantes. Por lo tanto, la invención provee métodos para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra uno o más antígenos de MERS y métodos para prevenir, reducir la incidencia, atenuar, o tratar la infección por MERS en un sujeto que lo necesite.

**[408]** Ha de apreciarse que la sección de Descripción Detallada, y no las secciones de Síntesis y Resumen, está destinada a usarse para la interpretación de las reivindicaciones. Las secciones de Síntesis y Resumen pueden establecer uno o más, aunque no todos los ejemplos de aspectos o formas de realización de la presente invención según lo contemplado por el o los inventores, y por lo tanto, no están destinadas a limitar la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

**[409]** La presente invención se ha descrito precedentemente con la ayuda de bloques de construcción funcionales que ilustran la implementación de funciones específicas y relaciones entre las mismas. Los límites de estos bloques de construcción funcionales se han definido en forma arbitraria en la presente para facilitar la descripción. Pueden definirse límites alternativos siempre y cuando las funciones específicas y las relaciones entre ellas se lleven a cabo en forma apropiada.

**[410]** La descripción precedente de los aspectos o formas de realización específicas divulgarán la naturaleza general de la invención en forma tan completa que, mediante la aplicación del conocimiento dentro de sus habilidades en la materia, otros podrán modificar y/o adaptar fácilmente diversas aplicaciones tales como los aspectos o las formas de realización específicas sin demasiada experimentación, sin alejarse del concepto general de la presente

invención. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones estarán dentro del significado y rango de los equivalentes de los aspectos o formas de realización divulgadas, en base al contenido y las pautas que se proveen en la presente. Ha de comprenderse que las expresiones o la terminología de la presente tienen un propósito descriptivo y no limitante, de manera que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva ha de interpretarse por los expertos en la materia teniendo en cuenta los contenidos y las pautas.

**[411]** La amplitud y el alcance de la presente invención no deben estar limitados por ninguno de los ejemplos antes descritos de aspectos o formas de realización, sino que se deben definir solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

| Tabla 17: Secuencias de Aminoácidos y Ácido Nucleico |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ<br>ID<br>NO                                      | Descripción                   | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 1                                                    | M1 (secuencia de aminoácidos) | MFLILLISLPTAFAVIGDLNCPLDPRLKGSFNNRDTGPPSISTDTVDVTN<br>GLGTYYYVLDREVYLNNTTLFLNGYYPTSGSTYRNMALKGTDKLSLWFKPPF<br>LSDFINGIFAKVKNTKVFKDGVMYSEFFAITIGSTFVNTSYSVVVQPRTI<br>NSTQDGVNKLQGLLEVSVQCQYNMCEYPHTICHPKLGNHFKELWHLDTGVV<br>SCLYKRNFTYDVNATYLYFHFYQEGGTFYAYFTDTGFVTKFLFNVYLGMA<br>LSHYVVMPLTCISRDLIGFTLEYWVTPLTPRQYLLAFNQDGIIFNAVDCM<br>SDFMSEIKCKTQSIAPPTGVYELNGYTVQPIADVRRKPDLPNCNIEAWL<br>NDKSVPSPLNWERKTFSNCFNMSSLSMSFIQADSFTCNNIDAAKIYGMCF<br>SSITIDKFAIPNRRKVDLQGLNGLYLQSSNYRIDTTATSCQLYYNLPAAN<br>VSVSRFNPSTWNKRFGFIEDSVFVPQPTGVFTNHSVVYAQHCFKAPKNFC<br>PCSSCPGKNNGIGTCPAGTNYLTCDNLCTLDPITFKAPDTYKCPQTKSLV<br>GIGEHCSGLAVKSDYCGNNSCTCQPQAFLGWSADSCLQGDKNIFANFIL<br>HDVNNGLTCSTDLQKANTEIELGVCVNYDLYGISGQGIFVEVNATYYNSW<br>QNLLYDSNGNLYGFRDYITNRTFMIHSCYSGRVSAAYHANSSEPALLFRN<br>IKCNYVFNNSLTRQLQPINYSFDSYLGCVVNAYNSTAISVQTCDLTVGSG<br>YCVDYSKNRRSRGAITTYRFTNFEPFTVNSVNDLEPVGGLYEIQIPSE<br>FTIGNMEEFIQTSSPKVTIDCAAFVCGDYAACKLQLVEYGSFCDNINAIL<br>TEVNELLDTTQLQVANSLMNGVTLSTKLKDGVNFNVDINFPVLGCLGS<br>ECSKASSRSAIEDLLFDKVKLSDVGFVEAYNNCTGGAEIRDLICVQSYKG<br>IKVLPPLLENQISGYTLAATSASLFPPWTAAAGVPFYLVNRYRINGLGV<br>TMDVLSQNQKLIANAFNNALHAIQQGFDAATNSALVKIQAVVNANAEALNN |

|   |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                  | LLQQLSNRFGAISASLQEILSRLEAEAEQIDRLINGRLTALNAYVSQQ<br>LSDSTLVKFSAQAAMEKVNCEVKSQSSRINFCGNGNHIISLVQNAPYGLY<br>FIHFNYVPTKYVTAKVSPGLCIAGNRGIAPKSGYFVNVNNTWMTGSGYY<br>YPEPITENNVVMSTCAVNYTKAPYVMLNTSIPNLPDFKEELDQWFKNQ<br>SVAPDLSLDYINVTFDLQVEMNRLQEAIKVLNHSYINLKDIGTYEYYVK<br>WPWYVWLLICLAGVAMLVLLFFICCTGCGTSCFKKCGGCCDDYTGYQEL<br>VIKTSHDD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2 | M1 (secuencia de ácido nucleico) | ATGTTTTTAATTTTATTAATTTCTTTACCAACAGCATTTCAGTAATTGG<br>AGATTTAATTTGTCCATTAGATCCAAGATTAAAAGGATCTTTTAATAATA<br>GAGATACAGGACCACCATCTATTTCTACAGATACAGTAGATGTAACAAAT<br>GGATTAGGAACATATTATGTATTAGATAGAGTATATTTAAATACAACATT<br>ATTTTAAATGGATATTATCCAACATCTGGATCTACATATAGAAATATGG<br>CATTAAAAGGAACAGATAAATTATCTACATTATGGTTTAAACCACCATTc<br>TTATCTGATTTTATTAATGGAATTTTGCAAAAGTAAAAAATACAAAAGT<br>ATTTAAAGATGGAGTAATGTATTCTGAATTTCCAGCAATTACAATTGGAT<br>CTACATTTGTAAATACATCTTATTCTGTAGTAGTACAACCAAGAACAATT<br>AATTCTACACAAGATGGAGTAAATAAATTACAAGGATTATTAGAAGTATC<br>TGTATGTCAATATAATATGTGTGAATATCCACATACAATTTGTCATCCAA<br>AATTAGGAAATCATTTTAAAGAATTATGGCATTTAGATACAGGAGTAGTA<br>TCTTGTTTATATAAAAGAAATTTTACATATGATGTAAATGCAACATATTT<br>ATATTTTCATTTcTATCAAGAAGGAGGAACATTTTATGCATATTTTACAG<br>ATACAGGATTTGTAACAAAATTcTTATTTAATGTATATTTAGGAATGGCA<br>TTATCTCATTATTATGTAATGCCATTAACATGTATTTCTAGATTAGATAT<br>TGGATTTACATTAGAATATTGGGTAAACACCATTAAACACCAAGACAATATT<br>TATTAGCATTTAATCAAGATGGAATTATTTTAAATGCAGTAGATTGTATG |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> TCTGATTTTATGTCTGAAATTAAATGTAAACACAATCTATTGCACCACC<br/> AACAGGAGTATATGAATTAAATGGATATACAGTACAACCAATTGCAGATG<br/> TATATAGAAGAAAACCAGATTTACCAAATTGTAATATTGAAGCATGGTTA<br/> AATGATAAATCTGTACCATCTCCATTAAATTGGGAAAGAAAAACATTTTC<br/> TAATTGTAATTTTAATATGTCTTCTTTAATGTCTTTTATTCAAGCAGATT<br/> CTTTTACATGTAATAATATTGATGCAGCAAAAATTTATGGAATGTGTTTc<br/> TCTTCTATTACAATTGATAAATTTGCAATTCCAAATAGAAGAAAAGTAGA<br/> TTTACAATTAGGAAATTTAGGATATTTACAATCTTCTAATTATAGAATTG<br/> ATACAACAGCAACATCTTGTCAATTATATTATAATTTACCAGCAGCAAAT<br/> GTATCTGTATCTAGATTTAATCCATCTACATGGAATAAAAGATTTGGATT<br/> TATTGAAGATTCTGTATTTGTACCACAACCAACAGGAGTATTTACAAATC<br/> ATTCTGTAGTATATGCACAACATTGTTTTAAAGCACCAAAAAATTTcTGT<br/> CCATGTTCTTCTTGTCCAGGAAAAAATAATGGAATTGGAACATGTCCAGC<br/> AGGAACAAATTATTTAACATGTGATAATTTATGTACATTAGATCCAATTA<br/> CATTTAAAGCACCAGATACATATAAATGTCCACAAACAAAATCTTTAGTA<br/> GGAATTGGAGAACATTGTTCTGGATTAGCAGTAAAATCTGATTATTGTGG<br/> AAATAATTCTTGTACATGTCAACCACAAGCATTTTTAGGATGGTCTGCAG<br/> ATTCTTGTTTACAAGGAGATAAATGTAATATTTTTGCAAATTTTATTTTA<br/> CATGATGTAAATAATGGATTAACATGTTCTACAGATTTACAAAAAGCAAA<br/> TACAGAAATTGAATTAGGAGTATGTGTAAATTATGATTTATATGGAATTT<br/> CTGGACAAGGAATTTTcGTAGAAGTAAATGCAACATATTATAATTCTTGG<br/> CAAAATTTATTATATGATTCTAATGGAAATTTATATGGATTTAGAGATTA<br/> TATTACAAATAGAACATTTATGATTCATTCTTGTTATTCTGGAAGAGTAT<br/> CTGCAGCATATCATGCAAATCTTCTGAACCAGCATTATTATTTAGAAAT<br/> ATTAAATGTAATTATGTATTTAATAATCTTTAACAAGACAATTACAACC </p> |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | AATTAATTATTCTTTTGATTCTTATTTAGGATGTGTAGTAAATGCATATA<br>ATTCTACAGCAATTTCTGTACAAACATGTGATTTAACAGTAGGATCTGGA<br>TATTGTGTAGATTATTCTAAAAATAGAAGATCTAGAgGAGCAATTACAAC<br>AGGATATAGATTTACAAATTTTGAACCATTACAGTAAATTCTGTAAATG<br>ATTCTTTAGAACCAGTAGGAGGATTATATGAAATTCAAATCCATCTGAA<br>TTTACAATTGGAAATATGGAAGAATTTATTCAAACATCTTCTCCAAAAGT<br>AACAAATTGATTGTGCAGCATTTGTATGTGGAGATTATGCAGCATGTAAAT<br>TACAATTAGTAGAATATGGATCTTTcTGTGATAATATTAATGCAATTTTA<br>ACAGAAGTAAATGAATTATTAGATACAACACAATTACAAGTAGCAAATTC<br>TTTAATGAATGGAGTAACATTATCTACAAAATTAAAAGATGGAGTAAATT<br>TTAATGTAGATGATATTAATTTcTCTCCAGTATTAGGATGTTTAGGATCT<br>GAATGTTCTAAAGCATCTTCTAGATCTGCAATTGAAGATTTATTATTTGA<br>TAAAGTAAAATTATCTGATGTAGGATTTGTAGAAGCATATAATAATTGTA<br>CAGGAGGAGCAGAAATTAGAGATTTAATTTGTGTACAATCTTATAAAGGA<br>ATTAAAGTATTACCACCATTATTATCTGAAAATCAAATTTCTGGATATAC<br>ATTAGCAGCAACATCTGCATCTTTATTTCCACCATGGACAGCAGCAGCAG<br>GAGTACCATTTTATTTAAATGTACAATATAGAATTAATGGATTAGGAGTA<br>ACAATGGATGTATTATCTCAAAATCAAAAATTAATTGCAAATGCATTTAA<br>TAATGCATTACATGCAATTCAACAAGGATTTGATGCAACAAATCTGCAT<br>TAGTAAAAATTCAAGCAGTAGTAAATGCAAATGCAGAAGCATTAAATAAT<br>TTATTACAACAATTATCTAATAGATTTGGAGCAATTTCTGCATCTTTACA<br>AGAAATTTTATCTAGATTAGATGCATTAGAAGCAGAAGCACAAATTGATA<br>GATTAATTAATGGAAGATTAACAGCATTAATGCATATGTATCTCAACAA<br>TTATCTGATTCTACATTAGTAAAATTTTCTGCAGCACAAGCAATGGAAAA<br>AGTAAATGAATGTGTAAATCTCAATCTTCTAGAATTAATTTcTGTGGAA |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|   |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                               | <p>ATGGAAATCATATTATTTCTTTAGTACAAAATGCACCATATGGATTATAT</p> <p>TTTATTCATTTTAATTATGTACCAACAAAATATGTAACAGCAAAAAGTATC</p> <p>TCCAGGATTATGTATTGCAGGAAATAGAGGAATTGCACCAAAAATCTGGAT</p> <p>ATTTTGTAAATGTAAATAATACATGGATGTATACAGGATCTGGATATTAT</p> <p>TATCCAGAACCAATTACAGAAAATAATGTAGTAGTAATGTCTACATGTGC</p> <p>AGTAAATTATACAAAAGCACCATATGTAATGTTAAATACATCTATTCCAA</p> <p>ATTTACCAGATTTTAAAGAAGAATTAGATCAATGGTTTAAAAATCAAACA</p> <p>TCTGTAGCACCAGATTTATCTTTAGATTATATTAATGTAACATTTTGA</p> <p>TTTACAAGTAGAAATGAATAGATTACAAGAAGCAATTAAAGTATTAAATC</p> <p>ATTCTTATATTAATTTAAAAGATATTGGAACATATGAATATTATGTAAAA</p> <p>TGGCCATGGTATGTATGGTTATTAATTTGTTTAGCAGGAGTAGCAATGTT</p> <p>AGTATTATTATTTTTcATTTGTTGTTGTACAGGATGTGGAACATCTTGTT</p> <p>TTAAAAAATGTGGAGGATGTTGTGATGATTATACAGGATATCAAGAATTA</p> <p>GTAATTAAAACATCTCATGATGATtaa</p> |
| 3 | M2 (secuencia de aminoácidos) | <p>MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDV</p> <p>SKADGIIYPQGRYTSNITITYQGLFPYQGDHGDYVYSAGHATGTTTPQKL</p> <p>FVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLG</p> <p>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS</p> <p>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI</p> <p>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSI</p> <p>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDFSVDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS</p> <p>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFK</p> <p>RLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL</p> <p>SMKSDLVSSAGPISQFNYKQSFNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI</p> <p>NKCSRLLSDDRTEVPQLVNAVQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG</p>                                                                                                                                                           |

|   |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                  | GGWLVASGSTVAMTEQLQMGGGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL<br>GNCVEYSLYGVSGRGVVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYYSDDGNYYC<br>LRACVSVPVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR<br>DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTTPRSV<br>RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTTIQ<br>KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLF<br>ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASAIEDLLFDKVTI<br>ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSS<br>LLGSIAGVGWTAGLSSFAAIPFAQSIFYRLNGVGITQQVLSENQKLIANK<br>FNQALGAMQTGFTTTNEAFRKVQDAVNNAQALSKLASELSNTFGAISAS<br>IGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTLNAFVAQQIVRSESAALSAQLAK<br>DKVNECVKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVVNAPNGLYFMHVGYYPSNHIEVV<br>SAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNNTRIVDEWSYTGSSFYAPEPITSL<br>NTKYVAPQVQTYQNI STNLPPPLLGNSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFG<br>SLTQINTTLLDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYTYYNKWPWYIW<br>LGFIAGLVALALCVFFILCCTGCGTNCMGKLKCNRCDDRYEEDLEPHKV<br>HVV |
| 4 | M2 (secuencia de ácido nucleico) | ATGATTCATTCTGTtTTcTTATTAATGTTcTTATTAACACCAACAGAATC<br>TTATGTAGATGTAGGACCAGATTCTGTAAATCTGCATGTATTGAAGTAG<br>ATATTCAACAAACATTTTTTGATAAAACATGGCCAAGACCAATTGATGTA<br>TCTAAAGCAGATGGAATTATTTATCCACAAGGAAGAACATATTCTAATAT<br>TACAATTACATATCAAGGATTATTTCCATATCAAGGAGATCATGGAGATA<br>TGTATGTATATTCTGCAGGACATGCAACAGGAACAACACCACAAAAATTA<br>TTTGTAGCAAATTATTCTCAAGATGTAAAACAATTTGCAAATGGATTTGT<br>AGTAAGAATTGGAGCAGCAGCAAATTCTACAGGAACAGTAATTATTTCTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> CATCTACATCTGCAACAATTAGAAAAATTTATCCAGCATTATGTTAGGA<br/> TCTTCTGTAGGAAATTTcTCTGATGGAAAAATGGGAAGATTTTTTAATCA<br/> TACATTAGTATTATTACCAGATGGATGTGGAACATTATTAAGAGCATTTT<br/> ATTGTATTTTAGAACCAAGATCTGGAAATCATTGTCCAGCAGGAAATCT<br/> TATACATCTTTTGCAACATATCATACACCAGCAACAGATTGTTCTGATGG<br/> AAATTATAATAGAAATGCATCTTTAAATCTTTTAAAGAATATTTTAATT<br/> TAAGAAATTGTACATTTATGTATACATATAATATTACAGAAGATGAAATT<br/> TTAGAATGGTTTGGAATTACACAAACAGCACAAGGAGTACATTTATTTTC<br/> TTCTAGATATGTAGATTTATATGGAGGAAATATGTTTCAATTTGCAACAT<br/> TACCAGTATATGATACAATTAATATTATTCTATTATTCCACATTCTATT<br/> AGATCTATTCAATCTGATAGAAAAGCATGGGCAGCATTTTATGTATATAA<br/> ATTACAACCATTAACtTTcTTATTAGATTTcTCTGTAGATGGATATATTA<br/> GAAGAGCAATTGATTGTGGATTTAATGATTTATCTCAATTACATTGTTCT<br/> TATGAATCTTTTGATGTAGAATCTGGAGTATATTCTGTATCTTCTTTTGA<br/> AGCAAAACCATCTGGATCTGTAGTAGAACAAGCAGAAGGAGTAGAATGTG<br/> ATTTcTCTCCATTATTATCTGGAACACCACCACAAGTATATAATTTTAAA<br/> AGATTAGTATTTACAAATTGTAATTATAATTTAACAAAATTATTATCTTT<br/> ATTTTCTGTAAATGATTTTACATGTTCTCAAATTTCTCCAGCAGCAATTG<br/> CATCTAATTGTTATTCTTCTTTAATTTTAGATTATTTcTCTTATCCATTA<br/> TCTATGAAATCTGATTTATCTGTATCTTCTGCAGGACCAATTTCTCAATT<br/> TAATTATAAACAAATCTTTcTCTAATCCAACATGTTTAATTTTAGCAACAG<br/> TACCACATAATTTAACAACAATTACAAAACCATTAATATATTCTTATATT<br/> AATAAATGTTCTAGATTATTATCTGATGATAGAACAGAAGTACCACAATT<br/> AGTAAATGCAAATCAATATTCTCCATGTGTATCTATTGTACCATCTACAG<br/> TATGGGAAGATGGAGATTATTATAGAAAACAATTATCTCCATTAGAAGGA </p> |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | GGAGGATGGTTAGTAGCATCTGGATCTACAGTAGCAATGACAGAACAAATT<br>ACAAATGGGATTTGGAATTACAGTACAATATGGAACAGATACAAATTCTG<br>TATGTCCAAAATTAGAATTTGCAAATGATACAAAAATTGCATCTCAATTA<br>GGAAATTGTGTAGAATATTCTTTATATGGAGTATCTGGAAGAGGAGTATT<br>TCAAAATTGTACAGCAGTAGGAGTAAGACAACAAAGATTTGTATATGATG<br>CATATCAAAATTTAGTAGGATATTATTCTGATGATGGAAATTATTATTGT<br>TTAAGAGCATGTGTATCTGTACCAGTATCTGTAATTTATGATAAAGAAAC<br>AAAAACACATGCAACATTATTTGGATCTGTAGCATGTGAACATATTTCTT<br>CTACAATGTCTCAATATTCTAGATCTACAAGATCTATGTTAAAAAGAAGA<br>GATTCTACATATGGACCATTACAAACACCAGTAGGATGTGTATTAGGATT<br>AGTAAATTCTTCTTTATTTGTAGAAGATTGTAAATTACCATTAGGACAAT<br>CTTTATGTGCATTACCAGATACACCATCTACATTAACACCAAGATCTGTA<br>AGATCTGTACCAGGAGAAATGAGATTAGCATCTATTGCATTTAATCATCC<br>AATTCAAGTAGATCAATTAAATTCTTCTTATTTTAAATTATCTATTCCAA<br>CAAATTTCTCTTTTGGAGTAACACAAGAATATATTCAAACAACAATTCAA<br>AAAGTAACAGTAGATTGTAAACAATATGTATGTAATGGATTTCAAAAATG<br>TGAACAATTATTAAGAGAATATGGACAATTTTGTCTAAAAATTAATCAAG<br>CATTACATGGAGCAAATTTAAGACAAGATGATTCTGTAAGAAATTTATTT<br>GCATCTGTAAAATCTTCTCAATCTTCTCCAATTATTCAGGATTTGGAGG<br>AGATTTTAATTTAACATTATTAGAACCAGTATCTATTTCTACAGGATCTA<br>GATCTGCAAGATCTGCAATTGAAGATTTATTATTTGATAAAGTAACAATT<br>GCAGATCCAGGATATATGCAAGGATATGATGATTGTATGCAACAAGGACC<br>AGCATCTGCAAGAGATTTAATTTGTGCACAATATGTAGCAGGATATAAAG<br>TATTACCACCATTAATGGATGTAAATATGGAAGCAGCATATACATCTTCT<br>TTATTAGGATCTATTGCAGGAGTAGGATGGACAGCAGGATTATCTTCTTT |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> TGCAGCAATTCCATTTGCACAATCTATaTTcTATAGATTAAATGGAGTAG<br/> GAATTACACAACAAGTATTATCTGAAAATCAAAAATTAATTGCAAATAAA<br/> TTTAATCAAGCATTAGGAGCAATGCAAACAGGATTTACAACAACAAATGA<br/> AGCATTTAGAAAAGTACAAGATGCAGTAAATAATAATGCACAAGCATTAT<br/> CTAAATTAGCATCTGAATTATCTAATACATTTGGAGCAATTTCTGCATCT<br/> ATTGGAGATATTATTCAAAGATTAGATGTATTAGAACAAGATGCACAAAT<br/> TGATAGATTAATTAATGGAAGATTAACAACATTAAATGCATTTGTAGCAC<br/> AACAAATTAGTAAGATCTGAATCTGCAGCATTATCTGCACAATTAGCAAAA<br/> GATAAAGTAAATGAATGTGTAAAAGCACAAATCTAAAAGATCTGGATTTTG<br/> TGGACAAGGAACACATATTGTATCTTTTGTAGTAAATGCACCAAATGGAT<br/> TATATTTTATGCATGTAGGATATTATCCATCTAATCATATTGAAGTAGTA<br/> TCTGCATATGGATTATGTGATGCAGCAAATCCAACAAATTGTATTGCACC<br/> AGTAAATGGATATTTTATTAAAACAAATAATACAAGAATTGTAGATGAAT<br/> GGTCTTATACAGGATCTTCTTTcTATGCACCAGAACCAATTACATCTTTA<br/> AATACAAAATATGTAGCACCACAAGTAACATATCAAAATATTTCTACAAA<br/> TTTACCACCACCATTATTAGGAAATTCTACAGGAATTGATTTTCAAGATG<br/> AATTAGATGAATTTTTTAAAAATGTATCTACATCTATTCCAAATTTTGGA<br/> TCTTTAACACAAATTAATACAACATTATTAGATTTAACATATGAAATGTT<br/> ATCTTTACAACAAGTAGTAAAAGCATTAAATGAATCTTATATTGATTTAA<br/> AAGAATTAGGAAATTATACATATTATAATAAATGGCCATGGTATATTTGG<br/> TTAGGATTTATTGCAGGATTAGTAGCATTAGCATTATGTGTATTcTTTAT<br/> TTTATGTTGTACAGGATGTGGAACAAATTGTATGGGAAAATTAAAATGTA<br/> ATAGATGTTGTGATAGATATGAAGAATATGATTTAGAACCACATAAAGTA<br/> CATGTACATtaa </p> |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|   |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 | M3 (secuencia de aminoácidos) | <p>MKLFLILLVLPLASCFFTCNSNANLSMLQLGVPDSSSTIVTGLLPTHWIC</p> <p>ANQSTSVYSANGFFYIDVGNHRSALHTGYVDVQYIIYVTNEIGLNAS</p> <p>VTLKICKFGINTTFDFLSNSSSSFDICVNLLFTEQLGAPLGITISGETVR</p> <p>LHLYNVTRTFYVPAAYKLTKLSVKCYFNYSCVFSVNVATVTNVNVTTHNGR</p> <p>VVNYTVCDCCNGYTDNIFSVQQDGRIPNGFFPNNWFLLTNGSTLVDGVSR</p> <p>LYQPLRLTCLWPVPGLKSSSTGFVYFNATGSDVNCNGYQHNSVADVMRYNL</p> <p>NFSANSVDNLKSGVIVFKTLQYDVLFYCSNSSSGVLDTTIPFGPSSQPYY</p> <p>CFINSTINTTHVSTFVGVLPPTVREIVVARTGQFYINGFKYFDLGFIEAV</p> <p>NFNVTASATDFWTVAFATFVDVLVNVSATKIQNLLYCDSPFEKLQCEHL</p> <p>QFGLQDGFYSANFLDDNVLPETYVALPIYYQHTDINFATASFGGSCYVC</p> <p>KPHQVNISLNGNTSVCVRTSHFSIRYIYNRVKSGSPGDSSWHIYLKSGTC</p> <p>PFSFSKLNNFQKFKTICFSTVAVPGSCNFPLEATWHYTSYTIVGALYVTW</p> <p>SEGNISITGVPPVSGIREFSNLVLNNCTKYNIYDYVGTGIIRSSNQSLAG</p> <p>GITYVSNNGNLLGFKNVSTGNIFIVTPCNQPDQVAVYQQSIIGAMTAVNE</p> <p>SRYGLQNLLQLPNFYVYVSNNGNCTTAVMTYSNFGICADGSLIPVRPRNS</p> <p>SDNGISAIITANLSIPSNWTTSVQVEYLQITSTPIVVDCAITYVCNGNPRC</p> <p>KNLLKQYTSACKTIEDALRLSAHLETNDVSSMLTFDSNAFSLANVTSFGD</p> <p>YNLSSVLPQRNIHSSRIAGRSALEDLLFSKVVTSGLGTVDDYKSC TKGL</p> <p>SIADLACAQYYNGIMVLPGVADAERMAMYTGSLIGGMVLGGLTSAAAI PF</p> <p>SLALQARLNYVALQTDVLQENQKILAASFNKAINNIVASFSSVNDAITQT</p> <p>AEAIHTVTIALNKIQDVVNQQGSALNHLTSQLRHNFAQISNSIQAIYDRL</p> <p>DSIQADQQVDRLITGRALALNAFVSQVLNKYTEVRSSRRLAQQKINECVK</p> <p>SQSNRYGFCGNGTHIFSIVNSAPDGLLFLHTVLLPTDYKNVKAWSGICVD</p> <p>GIYGYVLRQPNLVLYSDNGVFRVTSRVMFQPRLPVLSDFVQIYNCNVTFV</p> <p>NISRVELHTVIPDYVDVNKTLQEFANLPHYVKNPFDLTPFNLTYNLSS</p> |
|---|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|   |                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                        | ELKQLEAKTASLFQTTVELQGLIDQINSTYVDLKLLNRFENYIKWPWWVW<br>LIISVVFVVLSSLVFCCLSTGCCGCCNCLTSSMRGCCDCGSTKLPYYEF<br>EKVHVQ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 6 | M3 (secuencia<br>de ácido<br>nucleico) | ATGAAATTATTTTAAATTTATTAGTATTACCATTAGCATCTTGTTTTTT<br>TACATGTAATTCTAATGCAAATTTATCTATGTTACAATTAGGAGTACCAG<br>ATAATTCTTCTACAATTGTAACAGGATTATTACCAACACATTGGATTTGT<br>GCAAATCAATCTACATCTGTATATTCTGCAAATGGATTcTTcTATATTGA<br>TG TAGGAAATCATAGATCTGCATTTGCATTACATACAGGATATTATGATG<br>TAAATCAATATTATATTTATGTAACAAATGAAATTGGATTAAATGCATCT<br>GTAACATTAAAAATTTGTAAATTTGGAATTAATACAACATTTGATTTcTT<br>ATCTAATTCTTCTTCTTCTTTTGATTGTATTGTAAATTTATTATTTACAG<br>AACAAATTAGGAGCACCATTAGGAATTACAATTTCTGGAGAAACAGTAAGA<br>TTACATTTATATAATGTAACAAGAACATTTTATGTACCAGCAGCATATAA<br>ATTAACAAAATTATCTGTAAAATGTTATTTTAATTATTCTTGTGTATTTT<br>CTGTAGTAAATGCAACAGTAACAGTAAATGTAACAACACATAATGGAAGA<br>GTAGTAAATTATACAGTATGTGATGATTGTAATGGATATACAGATAATAT<br>TTTcTCTGTACAACAAGATGGAAGAATTCCAAATGGATTTCCATTTAATA<br>ATTGGTTcTTATTAACAAATGGATCTACATTAGTAGATGGAGTATCTAGA<br>TTATATCAACCATTAAGATTAACATGTTTATGGCCAGTACCAGGATTAAA<br>ATCTTCTACAGGATTTGTATATTTTAATGCAACAGGATCTGATGTAAATT<br>GTAATGGATATCAACATAATTCTGTAGCAGATGTAATGAGATATAATTTA<br>AATTTcTCTGCAAATTTCTGTAGATAATTTAAAATCTGGAGTAATTGTATT<br>TAAACATTACAATATGATGTATTATTTTATTGTTCTAATTCTTCTCTG<br>GAGTATTAGATACAACAATTCATTTGGACCATCTTCTCAACCATATTAT<br>TGTTTTATTAAATTCTACAATTAATACAACACATGTATCTACATTTGTAGG |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | AGTATTACCACCAACAGTAAGAGAAATTGTAGTAGCAAGAACAGGACAAT<br>TTTATATTAATGGATTTAAATATTTTGATTTAGGATTTATTGAAGCAGTA<br>AATTTTAATGTAACAACAGCATCTGCAACAGATTTTTGGACAGTAGCATT<br>TGCAACATTTGTAGATGTATTAGTAAATGTATCTGCAACAAAAATTCAAA<br>ATTTATTATATTGTGATTCTCCATTTGAAAAATTACAATGTGAACATTTA<br>CAATTTGGATTACAAGATGGATTTTATTCTGCAAATTTTTTAGATGATAA<br>TGTATTACCAGAAACATATGTAGCATTACCAATTTATTATCAACATACAG<br>ATATTAATTTTACAGCAACAGCATCTTTTGGAGGATCTTGTTATGTATGT<br>AAACCACATCAAGTAAATATTTCTTTAAATGGAAATACATCTGTATGTGT<br>AAGAACATCTCATTTcTCTATTAGATATATTTATAATAGAGTAAATCTG<br>GATCTCCAGGAGATTCTTCTTGGCATATTTATTTAAAATCTGGAACATGT<br>CCATTTTCTTTcTCTAAATTAAATAATTTTCAAAAATTTAAACAATTTG<br>TTTcTCTACAGTAGCAGTACCAGGATCTTGTAATTTTCCATTAGAAGCAA<br>CATGGCATTATACATCTTATACAATTGTAGGAGCATTATATGTAACATGG<br>TCTGAAGGAAATTCTATTACAGGAGTACCATATCCAGTATCTGGAATTAG<br>AGAATTTTCTAATTTAGTATTAAATAATTGTACAAAATATAATATTTATG<br>ATTATGTAGGAACAGGAATTATTAGATCTTCTAATCAATCTTTAGCAGGA<br>GGAATTACATATGTATCTAATTCTGGAAATTTATTAGGATTTAAAAATGT<br>ATCTACAGGAAATATaTTcATTGTAACACCATGTAATCAACCAGATCAAG<br>TAGCAGTATATCAACAATCTATTATTGGAGCAATGACAGCAGTAAATGAA<br>TCTAGATATGGATTACAAAATTTATTACAATTACCAAAcTTcTATTATGT<br>ATCTAATGGAGGAAATAATTGTACAACAGCAGTAATGACATATTCTAATT<br>TTGGAATTTGTGCAGATGGATCTTTAATTCCAGTAAGACCAAGAAATCT<br>TCTGATAATGGAATTTCTGCAATTATTACAGCAAATTTATCTATTCCATC<br>TAATTGGACAACATCTGTACAAGTAGAATATTTACAAATTACATCTACAC |
|--|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | CAATTGTAGTAGATTGTGCAACATATGTATGTAATGGAAATCCAAGATGT<br>AAAAATTTATTAAACAATATACATCTGCATGTAAACAATTGAAGATGC<br>ATTAAGATTATCTGCACATTTAGAAACAAATGATGTATCTTCTATGTTAA<br>CATTTGATTCTAATGCATTTTCTTTAGCAAATGTAACATCTTTTGGAGAT<br>TATAATTTATCTTCTGTATTACCACAAAGAAATATTCATTCTTCTAGAAT<br>TGCAGGAAGATCTGCATTAGAAGATTTATTATTTTCTAAAGTAGTAACAT<br>CTGGATTAGGAACAGTAGATGTAGATTATAAATCTTGTACAAAAGGATTA<br>TCTATTGCAGATTTAGCATGTGCACAATATTATAATGGAATTATGGTATT<br>ACCAGGAGTAGCAGATGCAGAAAGAATGGCAATGTATACAGGATCTTTAA<br>TTGGAGGAATGGTATTAGGAGGATTAACATCTGCAGCAGCAATTCCATTT<br>TCTTTAGCATTACAAGCAAGATTAAATTATGTAGCATTACAAACAGATGT<br>ATTACAAGAAAATCAAAAAATTTTAGCAGCATCTTTTAATAAGCAATTA<br>ATAATATTGTAGCATCTTTcTCTTCTGTAAATGATGCAATTACACAAACA<br>GCAGAAGCAATTCATACAGTAACAATTGCATTAAATAAAATTCAAGATGT<br>AGTAAATCAACAAGGATCTGCATTAAATCATTTAACATCTCAATTAAGAC<br>ATAATTTTCAAGCAATTTCTAATTCTATTCAAGCAATTTATGATAGATTA<br>GATTCTATTCAAGCAGATCAACAAGTAGATAGATTAATTACAGGAAGATT<br>AGCAGCATTAAATGCATTTGTATCTCAAGTATTAAATAAATATACAGAAG<br>TAAGATCTTCTAGAAGATTAGCACAAACAAAAATTAATGAATGTGTAAAA<br>TCTCAATCTAATAGATATGGATTTTGTGGAAATGGAACACATATTTTcTC<br>TATTGTAAATTCTGCACCAGATGGATTATTATTTTACATACAGTATTAT<br>TACCAACAGATTATAAgAATGTAAAAGCATGGTCTGGAATTTGTGTAGAT<br>GGAATTTATGGATATGTATTAAGACAACCAAATTTAGTATTATATTCTGA<br>TAATGGAGTATTTAGAGTAACATCTAGAGTAATGTTTCAACCAAGATTAC<br>CAGTATTATCTGATTTTGTACAAATTTATAATTGTAATGTAACATTTGTA |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|   |                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                                          | AATATTTCTAGAGTAGAATTACATACAGTAATTCCAGATTATGTAGATGT<br>AAATAAACATTACAAGAATTTGCACAAAATTTACCAAAATATGTAAAC<br>CAAATTTTGATTTAACACCATTTAATTTAACATATTTAAATTTATCTTCT<br>GAATTAAACAATTAGAAGCAAAAACAGCATCTTTATTTCAAACAACAGT<br>AGAATTACAAGGATTAATTGATCAAATTAATTCTACATATGTAGATTTAA<br>AATTATTAAATAGATTTGAAAATTATATTAAATGGCCATGGTGGGTATGG<br>TTAATTATTTCTGTAGTATTTGTAGTATTATTATCTTTATTAGTATTTTG<br>TTGTTTATCTACAGGATGTTGTGGATGTTGTAATTGTTTAACATCTTCTA<br>TGAGAGGATGTTGTGATTGTGGATCTACAAAATTACCATATTATGAATTT<br>GAAAAAGTACATGTACAAtaa |
| 7 | Promotor E/L<br>de S (secuencia<br>de ácido<br>nucleico) | Aaaaattgaaattttatttttttttttttggaaatataaataag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 8 | Promotor LEO<br>(secuencia de<br>ácido nucleico)         | Ttttatttttttttttttggaaatataaatatccggtaaaaattgaaaaaata<br>tacactaattagcgtctcgtttcagacgctagctcgag                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 9 | M4 (secuencia<br>de<br>aminoácidos)                      | MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS<br>TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNI<br>IRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIKVCEFQFCNYPFLYHKNNKSWM<br>ESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKHGNFKNLREFVFKNIDGYFKI<br>YSKHTPINLVRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTTPGD<br>SSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTL<br>KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW<br>NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIR                                                                            |

|    |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                  | <p>GDEVQRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLY</p> <p>RLFRKSNLKPFFERDISTEIYQAGSKPCNGVKGFNCYFPLQPYGFQPTYGV</p> <p>GYQPYRVVVLSEFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLT</p> <p>ESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQLEILDITPCSFGGVSVITPGTN</p> <p>TSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGA</p> <p>EHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAEN</p> <p>SVAYSNNIAIPTNFTISVTTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLL</p> <p>LQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFS</p> <p>QILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQ</p> <p>KFNGLTVLPPLLTDEMVAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA</p> <p>YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVN</p> <p>QNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQS</p> <p>LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFP</p> <p>QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFREGVFSNGTHWF</p> <p>VTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELD</p> <p>KYFKNHTSPDVLGDISGINASFVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL</p> <p>GKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSC</p> <p>CKFDEDDSEPVLKGVKLHYT</p> |
| 10 | M4 (secuencia de ácido nucleico) | <p>ATGTTTGTATTTTTAGTATTATTACCATTAGTATCTTCTCAATGTGTAAA</p> <p>TTTAACTACTAGAACTCAATTACCACCAGCTTATACTAATTCTTTTACTA</p> <p>GAGGAGTATATTATCCAGATAAAGTATTTAGATCTTCTGTATTACATTCT</p> <p>ACTCAAGATTTATTTTTTACCATTcTTcTCTAATGTAACCTGGTTTCATGC</p> <p>TATTCATGTATCTGGAACATAATGGAACATAAAGATTTGATAATCCAGTAT</p> <p>TACCATTTAATGATGGAGTATATTTTGCTTCTACTGAAAAATCTAATATT</p> <p>ATTAGAGGATGGATTTTTGGAACACTTTAGATTCTAAACTCAATCTTT</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> ATTAATTGTAAATAATGCTACTAATGTAGTAATTAAAGTATGTGAATTC<br/> AATTTTGTAATTATCCATTCTTATATCATAAAAAATAATAATCTTGGATG<br/> GAATCTGAATTTAGAGTATATTCTTCTGCTAATAATTGTACTTTTGAATA<br/> TGTATCTCAACCATTTTTAATGGATTTAGAAGGAAAACATGGAAATTTTA<br/> AAAATTTAAGAGAATTTGTATTTAAAAATATTGATGGATATTTTAAAT<br/> TATTCTAACATACTCCAATTAATTTAGTAAGAGATTTACCACAAGGATT<br/> TTCTGCTTTAGAACCATTAGTAGATTTACCAATTGGAATTAATATTACTA<br/> GATTTCAAACCTTTATTAGCTTTACATAGATCTTATTTAACTCCAGGAGAT<br/> TCTTCTTCTGGATGGACTGCTGGAGCTGCTGCTTATTATGTAGGATATTT<br/> ACAACCAAGAACTTTCTTATTTAAATATAATGAAAATGGAATTTACTG<br/> ATGCTGTAGATTGTGCTTTAGATCCATTATCTGAACTAAATGTACTTTA<br/> AAATCTTTTACTGTAGAAAAAGGAATTTATCAAACCTCTAATTTTAGAGT<br/> ACAACCAACTGAATCTATTGTAAGATTTCCAAATATTACTAATTTATGTC<br/> CATTTGGAGAAGTATTTAATGCTACTAGATTTGCTTCTGTATATGCTTGG<br/> AATAGAAAAAGAATTTCTAATTGTGTAGCTGATTATTCTGTATTATATAA<br/> TTCTGCTTCTTTCTCTACTTTTAAATGTTATGGAGTATCTCCAATAAAT<br/> TAAATGATTTATGTTTTACTAATGTATATGCTGATTCTTTTGTAATTAGA<br/> GGAGATGAAGTAAGACAAATTGCTCCAGGACAACTGGAATTTGCTGA<br/> TTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACTGGATGTGTAATTGCTTGA<br/> ATTCTAATAATTTAGATTCTAAAGTAGGAGGAAATTATAATTATTTATAT<br/> AGATTATTTAGAAAATCTAATTTAAACCATTTGAAAGAGATATTTCTAC<br/> TGAAATTTATCAAGCTGGATCTAAACCATGTAATGGAGTAAAAGGATTTA<br/> ATTGTTATTTTCCATTACAACCATATGGATTTCAACCAACTTATGGAGTA<br/> GGATATCAACCATATAGAGTAGTAGTATTATCTTTTGAATTATTACATGC<br/> TCCAGCTACTGTATGTGGACCAAAAAATCTACTAATTTAGTAAAAATA </p> |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | AATGTGTAAATTTTAATTTTAATGGATTAACTGGAAGCTGGAGTATTAAC<br>GAATCTAATAAAAAATTTTACCATTTCACAATTTGGAAGAGATATTGC<br>TGATACTACTGATGCTGTAAGAGATCCACAACTTTAGAAATTTAGATA<br>TTACTCCATGTTCTTTTGGAGGAGTATCTGTAATTACTCCAGGAACATA<br>ACTTCTAATCAAGTAGCTGTATTATATCAAGGAGTAAATTGTACTGAAGT<br>ACCAGTAGCTATTCATGCTGATCAATTAACCTCAACTTGGAGAGTATATT<br>CTACTGGATCTAATGTATTTCAAACCTAGAGCTGGATGTTTAATTGGAGCT<br>GAACATGTAAATAATTCTTATGAATGTGATATTCCAATTGGAGCTGGAAT<br>TTGTGCTTCTTATCAAACCTCAAACATAATTCTCCAAGAAGAGCTAGATCTG<br>TAGCTTCTCAATCTATTATTGCTTATACTATGTCTTTAGGAGCTGAAAA<br>TCTGTAGCTTATTCTAATAATTCTATTGCTATTCCAACATAATTTACTAT<br>TTCTGTAACTACTGAAATTTTACCAGTATCTATGACTAAAACCTCTGTAG<br>ATTGTACTATGTATATTTGTGGAGATTCTACTGAATGTTCTAATTTATTA<br>TTACAATATGGATCTTTTTGTACTCAATTAAATAGAGCTTTAACTGGAAT<br>TGCTGTAGAACAAGATAAAAAATACTCAAGAAGTATTTGCTCAAGTAAAC<br>AAATTTATAAACTCCACCAATTAAAGATTTTGGAGGATTTAATTTCTCT<br>CAAATTTTACCAGATCCATCTAAACCATCTAAAAGATCTTTTATTGAAGA<br>TTTATTATTTAATAAAGTAACTTTAGCTGATGCTGGATTTATTAAACAAT<br>ATGGAGATTGTTTAGGAGATATTGCTGCTAGAGATTTAATTTGTGCTCAA<br>AAATTTAATGGATTAACTGTATTACCACCATTATTAACCTGATGAAATGGT<br>AGCTCAATATACTTCTGCTTTATTAGCTGGAACCTATTACTTCTGGATGGA<br>CTTTTGGAGCTGGAGCTGCTTTACAAATTCATTTGCTATGCAATGGCT<br>TATAGATTTAATGGAATTGGAGTAACTCAAATGTATTATATGAAAATCA<br>AAAATTAATTGCTAATCAATTTAATTCTGCTATTGGAAAAATTCAAGATT<br>CTTTATCTTCTACTGCTTCTGCTTTAGGAAAATTACAAGATGTAGTAAAT |
|--|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                               | CAAAATGCTCAAGCTTTAAATACTTTAGTAAAACAATTATCTTCTAATTT<br>TGGAGCTATTTCTTCTGTATTAAATGATATTTTATCTAGATTAGATAAAG<br>TAGAAGCTGAAGTACAAATTGATAGATTAATTACTGGAAGATTACAATCT<br>TTACAACTTATGTAACCAACAATTAATTAGAGCTGCTGAAATTAGAGC<br>TTCTGCTAATTTAGCTGCTACTAAAATGTCTGAATGTGTATTAGGACAAT<br>CTAAAAGAGTAGATTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTAATGTCTTTTCCA<br>CAATCTGCTCCACATGGAGTAGTATTTTACATGTAACCTATGTACCAGC<br>TCAAGAAAAAATTTTACTACTGCTCCAGCTATTTGTCATGATGGAAAAG<br>CTCATTTTCCAAGAGAAGGAGTATTTGTATCTAATGGAACCTATTGGTTT<br>GTAACCTCAAAGAAATTTCTATGAACCACAAATTATTACTACTGATAATAC<br>TTTTGTATCTGGAAATTGTGATGTAGTAATTGGAATTGTAAATAAATACTG<br>TATATGATCCATTACAACCAGAATTAGATTCTTTTAAAGAAGAATTAGAT<br>AAATATTTTAAAAATCATACTTCTCCAGATGTAGATTTAGGAGATATTTT<br>TGGAATTAATGCTTCTTTTGTAAATATTCAAAAAGAAATTGATAGATTAA<br>ATGAAGTAGCTAAAAATTTAAATGAATCTTTAATTGATTTACAAGAATTA<br>GGAAAATATGAACAATATATTAAATGGCCATGGTATATTTGGTTAGGATT<br>TATTGCTGGATTAATTGCTATTGTAATGGTAACTATTATGTTATGTTGTA<br>TGACTTCTTGTTGTTCTTGTTTAAAAGGATGTTGTTCTTGTGGATCTTGT<br>TGTAAATTTGATGAAGATGATTCTGAACCAGTATTAAAAGGAGTAAATTT<br>ACATTATACTtaa |
| 11 | MB (secuencia de aminoácidos) | MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS<br>TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNI<br>IRGWIFGTTLDSTQSLILVNNATNVVIKVEFQFCNDPFLGVYHKNNK<br>SWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGY<br>FKIYSKHTEPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|    |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                  | <p>PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK</p> <p>CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV</p> <p>YAWNRKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSF</p> <p>VIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYN</p> <p>YLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPT</p> <p>NGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTG</p> <p>VLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLTILDITPCSFGGVSVITP</p> <p>GTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL</p> <p>IGAHEVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG</p> <p>AENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC</p> <p>NLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGF</p> <p>NFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLI</p> <p>CAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAM</p> <p>QMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQD</p> <p>VVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGR</p> <p>LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM</p> <p>SFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGT</p> <p>HWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKE</p> <p>ELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL</p> <p>QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSC</p> <p>GSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT</p> |
| 12 | MB (secuencia de ácido nucleico) | <p>ATGTTTGTATTTTGTAGTATTATTACCATTAGTATCTTCTCAATGTGTAAA</p> <p>TTTAACTACTAGAACTCAATTACCACCAGCTTATACTAATTCTTTTACTA</p> <p>GAGGAGTATATTATCCAGATAAAGTATTTAGATCTTCTGTATTACATTCT</p> <p>ACTCAAGATTTATTTTACCATTcTTcTCTAATGTAAGTTGGTTTCATGC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> TATTCATGTATCTGGAAC TAATGGAAC TAAAAGATTTGATAATCCAGTAT<br/> TACCATTTAATGATGGAGTATATTTTGCTTCTACTGAAAAATCTAATATT<br/> ATTAGAGGATGGATTTTTTGGAAC TACTTTAGATTCTAAAC TCAATCTTT<br/> ATTAATTGTAAATAATGCTACTAATGTAGTAATTAAAGTATGTGAATTC<br/> AATTTTGTAATGATCCATTTTTAGGAGTATATTATCATAAAAAATAATAA<br/> TCTTGATGGAATCTGAATTTAGAGTATATTCTTCTGCTAATAATTGTAC<br/> TTTTGAATATGTATCTCAACCATTTTAATGGATTTAGAAGGAAAACAAG<br/> GAAATTTTAAAAATTTAAGAGAATTTGTATTTAAAAATATTGATGGATAT<br/> TTTAAATTTATTCTAAACATACTCCAATTAATTTAGTAAGAGATTTACC<br/> ACAAGGATTTTCTGCTTTAGAACCATTAGTAGATTTACCAATTGGAATTA<br/> ATATTACTAGATTTCAAAC TTTATTAGCTTTACATAGATCTTATTTAACT<br/> CCAGGAGATTCTTCTTCTGGATGGACTGCTGGAGCTGCTGCTTATTATGT<br/> AGGATATTTACAACCAAGAACTTTcTTATTAAATATAATGAAAATGGAA<br/> CTATTACTGATGCTGTAGATTGTGCTTTAGATCCATTATCTGAACTAAA<br/> TGTACTTTAAATCTTTTACTGTAGAAAAAGGAATTTATCAAAC TCTAA<br/> TTTTAGAGTACAACCAACTGAATCTATTGTAAGATTTCCAAATATTACTA<br/> ATTTATGTCCATTTGGAGAAGTATTTAATGCTACTAGATTTGCTTCTGTA<br/> TATGCTTGGAATAGAAAAAGAATTTCTAATTGTGTAGCTGATTATTCTGT<br/> ATTATATAATTCTGCTTCTTTcTCTACTTTTAAATGTTATGGAGTATCTC<br/> CAACTAAATTAAATGATTTATGTTTTACTAATGTATATGCTGATTCTTTT<br/> GTAATTAGAGGAGATGAAGTAAGACAAATTGCTCCAGGACAAACTGGAAA<br/> AATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACTGGATGTGTAA<br/> TTGCTTGGAATTTCTAATAATTTAGATTCTAAAGTAGGAGGAAATTATAAT<br/> TATTTATATAGATTATTTAGAAAATCTAATTTAAAACCATTTGAAAGAGA<br/> TATTTCTACTGAAATTTATCAAGCTGGATCTACTCCATGTAATGGAGTAG </p> |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> AAGGATTTAATTGTTATTTTCCATTACAATCTTATGGATTTCAACCAACT<br/> AATGGAGTAGGATATCAACCATATAGAGTAGTAGTATTATCTTTTGAATT<br/> ATTACATGCTCCAGCTACTGTATGTGGACCAAAAAAATCTACTAATTTAG<br/> TAAAAAATAAATGTGTAAATTTTAATTTTAATGGATTAACTGGAAGTGA<br/> GTATTAACTGAATCTAATAAAAAATTTTACCATTTCACAATTTGGAAG<br/> AGATATTGCTGATACTACTGATGCTGTAAGAGATCCACAACTTTAGAAA<br/> TTTTAGATATTACTCCATGTTCTTTTGGAGGAGTATCTGTAATTACTCCA<br/> GGAAC TAATACTTCTAATCAAGTAGCTGTATTATATCAAGGAGTAAATTG<br/> TACTGAAGTACCAGTAGCTATTCATGCTGATCAATTAAC TCCA ACTTGGA<br/> GAGTATATTCTACTGGATCTAATGTATTTCAA ACTAGAGCTGGATGTTTA<br/> ATTGGAGCTGAACATGTAAATAATTCTTATGAATGTGATATTCCAATTGG<br/> AGCTGGAATTTGTGCTTCTTATCAA ACTCAA ACTAATTCTCCAAGAAGAG<br/> CTAGATCTGTAGCTTCTCAATCTATTATTGCTTATACTATGTCTTTAGGA<br/> GCTGAAAATTCTGTAGCTTATTCTAATAATTCTATTGCTATTCCA ACTAA<br/> TTTTACTATTTCTGTAACTACTGAAATTTTACCAGTATCTATGACTAAAA<br/> CTTCTGTAGATTGTACTATGTATATTTGTGGAGATTCTACTGAATGTTCT<br/> AATTTATTATTACAATATGGATCTTTTGTACTCAATTAAATAGAGCTTT<br/> AACTGGAATTGCTGTAGAACAAGATAAAAAACTCAAGAAGTATTTGCTC<br/> AAGTAAAACAAATTTATAAA ACTCCACCAATTAAAGATTTTGGAGGATTT<br/> AATTTCTCTCAAATTTTACCAGATCCATCTAAACCATCTAAAAGATCTTT<br/> TATTGAAGATTTATTATTTAATAAAGTAACTTTAGCTGATGCTGGATTTA<br/> TTAAACAATATGGAGATTGTTTAGGAGATATTGCTGCTAGAGATTTAATT<br/> TGTGCTCAAAAATTTAATGGATTAACTGTATTACCACCATTATTA ACTGA<br/> TGAAATGATTGCTCAATATACTTCTGCTTTATTAGCTGGA ACTATTACTT<br/> CTGGATGGACTTTTGGAGCTGGAGCTGCTTTACAAATTCATTTGCTATG </p> |
|--|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | CAAATGGCTTATAGATTTAATGGAATTGGAGTAACTCAAAATGTATTATA<br>TGAAAATCAAAAATTAATTGCTAATCAATTTAATTCTGCTATTGGAAAAA<br>TTCAAGATTCTTTATCTTCTACTGCTTCTGCTTTAGGAAAAATTACAAGAT<br>GTAGTAAATCAAAATGCTCAAGCTTTAAATACTTTAGTAAAACAATTATC<br>TTCTAATTTTGGAGCTATTTCTTCTGTATTAAATGATATTTTATCTAGAT<br>TAGATAAAGTAGAAGCTGAAGTACAAATTGATAGATTAATTACTGGAAGA<br>TTACAATCTTTACAACTTATGTAAGTCAACAATTAATTAGAGCTGCTGA<br>AATTAGAGCTTCTGCTAATTTAGCTGCTACTAAAATGTCTGAATGTGTAT<br>TAGGACAATCTAAAAGAGTAGATTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTAATG<br>TCTTTTCCACAATCTGCTCCACATGGAGTAGTATTTTACATGTAACCTA<br>TGTACCAGCTCAAGAAAAAAATTTTACTACTGCTCCAGCTATTTGTCATG<br>ATGGAAAAGCTCATTTTCCAAGAGAAGGAGTATTTGTATCTAATGGAAGT<br>CATTTGGTTTGTAAGTCAAGAAAATTTcTATGAACCACAAATTATTACTAC<br>TGATAATACTTTTGTATCTGGAAATTGTGATGTAGTAATTGGAATTGTAA<br>ATAATACTGTATATGATCCATTACAACCAGAATTAGATTCTTTTAAAGAA<br>GAATTAGATAAATATTTTAAAAATCATACTTCTCCAGATGTAGATTTAGG<br>AGATATTTCTGGAATTAATGCTTCTGTAGTAAATATTCAAAAAGAAATTG<br>ATAGATTAAATGAAGTAGCTAAAAATTTAAATGAATCTTTAATTGATTTA<br>CAAGAATTAGGAAAATATGAACAATATATTAAATGGCCATGGTATATTTG<br>GTTAGGATTTATTGCTGGATTAATTGCTATTGTAATGGTAACTATTATGT<br>TATGTTGTATGACTTCTTGTTGTTCTTGTTTAAAAGGATGTTGTTCTTGT<br>GGATCTTGTTGTAAATTTGATGAAGATGATTCTGAACCAGTATTAAAAGG<br>AGTAAAATTACATTATACTtaa |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13 | M5 (secuencia de aminoácidos) | MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDV<br>SKADGIIYPQGR TYSNITITYQGLFPYQGDHGD MYVYSAGHATG TTPQKL<br>FVANYSQDV KQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYP AFMLG<br>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS<br>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI<br>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPH SI<br>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDFSVDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS<br>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFK<br>RLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL<br>SMKSDL SVSSAGPISQFNYKQSF SNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI<br>NKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG<br>GGWLVASGSTVAMTEQLQMGGGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL<br>GNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYSDDGNYC<br>LRACVSVPVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR<br>DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPSTLT PRSV<br>RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNF SFGVTQEYIQTTIQ<br>KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFC SKINQALHGANLRQDDSVRNLF<br>ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSR SARS AIEDLLFDKVTI<br>ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQKFNGLT VLPPLLTD DMIAAYTAA<br>LVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ NVLYENQKQIANQ<br>FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA ISSV<br>LNDILSRLD <b>PPE</b> AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQ LIRAAEIRASANLAA<br>TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQEKNFT<br>TAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNC<br>DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELD KYFKNHTSPDVDLGDISGINASV |
|----|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                        | VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIA<br>IVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 14 | M5 (secuencia<br>de ácido<br>nucleico) | ATGATCCATTCTGTCTTCTTGCTTATGTTTTTGTGACGCCCACTGAGTC<br>TTACGTGGACGTGGGCCCCGACTCTGTTAAGAGCGCATGCATTGAGGTCG<br>ATATACAACAAACATTTTTTGTGACAAGACCTGGCCCCGGCCGATAGACGTT<br>AGCAAAGCAGATGGAATAATTTATCCCCAGGGGCGTACTTATTCCAACAT<br>AACGATCACATACCAGGGCCTGTTCCCGTATCAAGGCGACCACGGTGATA<br>TGTACGTATACAGTGCGGGCCATGCGACGGGCACGACGCCGAGAAGTTG<br>TTTGTAGCCAACTACAGTCAAGATGTCAAGCAATTCGCCAACGGCTTCGT<br>CGTACGCATCGGTGCAGCTGCGAATTCTACCGGTACCGTGATTATTAGTC<br>CGTCGACCTCAGCTACCATTTCGAAAAATCTATCCAGCGTTCATGCTCGGT<br>TCCTCAGTTGGGAACTTTTCTGACGGGAAAAATGGGTGCGTTCTTCAATCA<br>TACCCTCGTCCTCCTCCCAGATGGATGCGGCACACTGCTTCGCGCCTTCT<br>ATTGCATACTAGAACCAAGATCCGGCAACCATTGCCCTGCAGGGAACAGC<br>TATACATCCTTTGCAACCTATCACACTCCAGCGACCGACTGTTCTGATGG<br>TAACTATAATAGAAATGCGTCACTAAACAGCTTTAAGGAGTATTTTAATT<br>TACGCAACTGTACCTTTATGTACACGTATAATATCACAGAGGATGAGATT<br>CTCGAGTGGTTCGGTATAACTCAAACGGCTCAAGGGGTGCATTTATTCTC<br>CTCACGGTATGTGACCTGTACGGCGGAAATATGTTCCAATTCGCCACCT<br>TGCCGGTATACGACACTATTAAGTACTACTCTATTATCCCACATAGCATC<br>CGTTCAATCCAGAGTGATCGCAAAGCTTGGGCTGCGTTCTATGTGTACAA<br>GTTGCAACCCTTAACTTTCTTGCTAGACTTTAGCGTCGATGGTTACATCC<br>GAAGAGCCATTGACTGTGGATTCAACGACCTATCGCAACTGCATTGTTCA<br>TACGAGTCGTTGATGTGAAAGCGGTGTTTATTTCAGTCAGTAGCTTTGA<br>AGCCAAGCCGTCGGGCTCTGTTGTGCAACAGGCGGAAGGAGTAGAATGCG |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p>           ACTTTTCCCCGCTACTATCAGGCACTCCTCCTCAAGTGTAACAATTTCAA<br/>           AGACTAGTATTACAACTGTAATTACAACCTTACCAAATTACTATCGCT<br/>           CTTTTCCGTCAACGATTTTACCTGCTCACAGATTTCTCCTGCCGCGATAG<br/>           CATCTAATTGCTACTCTTCTTTGATTCTTGATTACTTTTCGTATCCACTT<br/>           TCCATGAAGTCTGATTTGTCAGTATCCTCTGCTGGCCCGATCTCCCAGTT<br/>           TAATTACAAGCAGTCTTTTAGTAATCCCACGTGTCTAATTCTTGCTACCG<br/>           TACCTCACAACCTTAACAACGATAACAAAGCCCCCTAAAGTACTCGTACATT<br/>           AACAAAGTGTTCCAGGTTACTGTGCGATGATCGGACGGAGGTTCCACAATT<br/>           AGTCAACGCCAACCAATACTCACCATGCGTGTCCATAGTGCCCTCCACAG<br/>           TATGGGAAGATGGAGATTACTATCGGAAACAGCTATCTCCATTAGAAGGG<br/>           GGGGGTTGGCTTGTGCGCTCAGGATCCACAGTAGCTATGACTGAGCAATT<br/>           ACAAATGGGTTTTGGGATCACGGTGCAGTACGGGACGGACACAAATAGTG<br/>           TATGTCCAAAGCTAGAGTTCGCCAATGACACCAAAATCGCCTCACAGCTA<br/>           GGCAATTGTGTGGAATATTCTTTATATGGTGTTTCGGGCCGAGGAGTATT<br/>           CCAGAATTGTACCGCCGTTGGAGTTCGGCAACAGAGGTTTCGTTTATGATG<br/>           CCTACCAAAATCTGGTCGGCTATTATTTCGGATGACGGTAACTATTATTGC<br/>           TTAAGAGCATGCGTTTCCGTACCCGTTAGCGTTATCTACGATAAGGAAAC<br/>           AAAAACCCATGCAACACTATTTGGTAGCGTAGCCTGTGAACATATCTCGT<br/>           CCACCATGTGCGAGTATTCCAGGTCTACTCGTTCCATGCTGAAGCGGCGT<br/>           GACTCTACATATGGACCACTGCAGACTCCGGTGGGGTGCGTATTGGGACT<br/>           CGTCAATTCTAGTCTTTTTGTAGAAGATTGTAAATTGCCCTGGGACAAT<br/>           CTTTATGCGCTCTGCCAGATACACCAAGTACTTTGACACCACGAAGTGTG<br/>           AGGTCGGTGCCCGGTGAAATGCGTCTTGATCGATTGCGTTCAACCACCC<br/>           TATACAAGTCGACCAATTAAATTCCTCCTATTTTAACTTTCAATCCCAA<br/>           CTAACTTTTCTTTGGGGTGACGCAGGAATATATCCAAACCACCATCCAA         </p> |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAAGTCACCGTAGATTGCAAGCAGTACGTGTGTAATGGTTTTTCAAAAATG<br>CGAGCAACTTTTACGAGAGTACGGTCAGTTCTGTTCCAAAATCAATCAAG<br>CTCTCCACGGGGCGAACTTGAGGCAAGACGACTCGGTACGTAATCTGTTT<br>GCCTCCGTCAAAAGTTGCAATCGTCTCCGATCATCCCGGGCTTCGGGGG<br>AGACTTTAATCTGACGCTGCTAGAACCTGTATCAATTTCCACGGGCTCGA<br>GAAGCGCCAGGAGTGCCATAGAGGACCTACTGTTGACAAAAGTAACGATA<br>GCAGACCCTGGATACATGCAGGGTTATGATGACTGTATGCAGCAAGGCC<br>CGCTAGCGCTCGAGACTTGATTTGCGCACAAAAGTTTAATGGTCTCACCG<br>TGCTTCCCCCGCTACTGACTGATGACATGATCGCCGCATATACGGCAGCG<br>TTAGTATCCGGAACGGCAACAGCGGGTTGGACATTCGGCGCAGGCGCTGC<br>CTTACAGATACCATTCGCAATGCAGATGGCATAACCGATTCAACGGTATCG<br>GGGTTACCCAGAACGTACTTTATGAAAACCAAAAACAAATTGCCAACCAA<br>TTCAATAAAGCAATTTTCGAGATCCAGGAGAGCTTGACAACAACGTCGAC<br>GGCCCTCGGCAAGCTACAGGACGTGGTAAACCAGAATGCACAGGCTCTTA<br>ATACACTTGTA AACAGTTATCATCAAATTTTGGCGCGATCTCTTCTGTG<br>CTGAATGACATCCTGTGCGCTCTCGATCCACCTGAGGCGGAGGTCCAGAT<br>AGACAGGTTGATAACGGGTCGTTTACAGTCATTGCAGACATACGTTACAC<br>AACAACTCATTTCGAGCAGCAGAGATACGCGCGTCCGCTAACCTAGCGGCT<br>ACCAAAATGTCCGAATGTGTGCTAGGCCAATCGAAACGAGTAGATTTCTG<br>TGGGAAAGGCTACCACCTCATGTCCCTTCCCCAAGCAGCTCCACATGGCG<br>TGGTCTTTCTACATGTCACGTACGTGCCTTCACAAGAAAAGAATTTTACC<br>ACCGCGCCTGCAATTTGCCACGAGGGGAAAGCCTATTTTCCGAGGGAAGG<br>GGTTTTCGTTTTCAATGGGACCTCTTGGTTCATTACCCAACGTAATTTCT<br>TCTCGCCACAAATTATTACTACGGACAATACTTTTCGTAAGTGGGAAGTGT<br>GATGTAGTTATTGGAATAATCAACAATACAGTCTATGACCCCCCTCCAGCC |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                          | AGAACTGGACTCTTTCAAAGAAGAGCTTGATAAGTATTTCAAGAATCACA<br>CCAGCCCTGACGTGGACCTAGGAGATATATCAGGGATAAACGCATCAGTG<br>GTGAATATACAGAAGGAGATTGACCGGCTAAACGAAGTCGCGAAGAACCT<br>TAACGAGTCGTTAATTGACCTGCAAGAACTCGGGAAGTACGAACAGTACA<br>TTAAGTGGCCTTGGTACGTATGGTTAGGGTTTATAGCCGGACTCATCGCG<br>ATAGTCATGGTGACTATTCTCCTCTGCTGCATGACATCTTGCTGCAGCTG<br>TCTGAAGGGGGCATGTAGTTGTGGCAGCTGTTGCAAATTTGACGAGGATG<br>ATAGCGAACCGGTGCTTAAGGGCGTAAATTTACTACTACACCTAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 15 | M5 + D510G<br>(secuencia de aminoácidos) | MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDV<br>SKADGIIYPQGRYTSNITITYQGLFPYQGDHGDYVVSAGHATGTTTPQKL<br>FVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIIISPSTSATIRKIYPAFMLG<br>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS<br>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI<br>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSI<br>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDVSDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS<br>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFK<br>RLVFTNCNYNLTKLKLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL<br>SMKSDLVSSAGPISQFNYKQSFSNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI<br>NKCSRLLSDGRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG<br>GGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL<br>GNCVEYSLYGVSGRGVFQNTAVGVRQQRFFVYDAYQNLVGYSDDGNYYC<br>LRACVSPVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR<br>DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTPRS<br>RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSEFGVTQEYIQTTIQ |

|    |                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                              | KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLF<br>ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASAIEDLLFDKVTI<br>ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAA<br>LVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQ<br>FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV<br>LNDILSRDPPAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQILRAAEIRASANLAA<br>TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQEKNT<br>TAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNC<br>DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV<br>VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIA<br>IVMVTILLCCMTSCCCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT                                                                                                                                                                    |
| 16 | M5 + I529T<br><br>(secuencia de aminoácidos) | MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDV<br>SKADGIIYPQGRYTSNITITYQGLFPYQGDHGDYVVSAGHATGTTPQKL<br>FVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIIISPSTSATIRKIYPAFMLG<br>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS<br>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI<br>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSI<br>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDVSDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS<br>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTTPPVYNFK<br>RLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL<br>SMKSDLVSSAGPISQFNYKQSFSNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI<br>NKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSTVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG<br>GGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL<br>GNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYSDDGNYC<br>LRACVSPVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR |

|    |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                        | DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDT PSTLT PRSV<br>RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTTIQ<br>KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLF<br>ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASAIEDLLFDKVTI<br>ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAA<br>LVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQ<br>FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV<br>LNDILSRDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQILRAAEIRASANLAA<br>TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQEKNT<br>TAPAICHEGKAYFPREGVFVFNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNC<br>DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV<br>VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIA<br>IVMVTILLCCMTSCCSCCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPV LKGVKLHYT |
| 17 | M5 + D510G +<br>I529T<br>(secuencia de<br>aminoácidos) | MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDV<br>SKADGIIYPQGR TYSNITITYQGLFPYQGDHGD MYVVSAGHATG TTPQKL<br>FVANYSQDV KQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLG<br>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS<br>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI<br>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSI<br>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLD FSVDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS<br>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFK<br>RLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL<br>SMKSDL SVSSAGPISQFNYKQSFSNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI<br>NKCSRLLSDEGRTEVPQLVNANQYSPCVSTVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG<br>GGWLVASGSTVAMTEQLQMGGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL                                               |

|    |                                                                            |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                            |   | <p>GNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYYSDDGNYYC</p> <p>LRACVSVFVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR</p> <p>DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTTPRSV</p> <p>RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTTIQ</p> <p>KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLF</p> <p>ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASAIEDLLFDKVTI</p> <p>ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAA</p> <p>LVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQ</p> <p>FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV</p> <p>LNDILSRDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQILIRAAEIRASANLAA</p> <p>TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQEKNT</p> <p>TAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNC</p> <p>DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDXYFKNHTSPDVDLGDISGINASV</p> <p>VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIA</p> <p>IVMVTILLCCMTSCCCLKGACSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLHYT</p> |
| 18 | Proteína<br>Mosaico<br>de<br>CoV de Tipo<br>MERS-<br>CoV/Murciélag<br>SARS | S | <p>MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKWTWPRPIDV</p> <p>SKADGIIYPQGRYTNITITYQGLFPYQGDHGDYVVSAGHATGTTPQKL</p> <p>FVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIIISPSTSATIRKIYPAFMLG</p> <p>SSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNS</p> <p>YTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEI</p> <p>LEWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSI</p> <p>RSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTFLLDVSDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCS</p> <p>YESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQAEGVECDFSPLLSGTPPQVYNFK</p> <p>RLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPL</p> <p>SMKSDLVSSAGPISQFNYKQSFNPTCLILATVPHNLTTITKPLKYSYI</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | <p> NKCSRLLSDDRTEVPQLVNNANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQLSPLEG<br/> GGWLVASGSTVAMTEQLQMGGGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQL<br/> GNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRQQRFVYDAYQNLVGYSDDGNYC<br/> LRACVSVFVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKRR<br/> DSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLTPRS<br/> RSVPGEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTITQ<br/> KVTVDCKQYVCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLF<br/> ASVKSSQSSPIIPGFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASAIEDLLFDKVTI<br/> ADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAA<br/> LVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQ<br/> FNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV<br/> LNDILSRLD<u>KV</u>EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQILIRAAEIRASANLAA<br/> TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQEKNT<br/> TAPAICHEGKAYFPREGVFVFNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNC<br/> DVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV<br/> VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIA<br/> IVMVTILLCCMTSCCSCCLKGACSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLHYT </p> |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|