

ESTRATEGIAS RESPECTO AL DESARROLLO DE VACUNAS PARA SARS-CoV-2

Oscar Bottasso
IDICER (UNR-CONICET)

Al referirnos a la gama de vacunas que se están desarrollando contra el SARS-CoV-2 la misma se puede agrupar en función de las distintas estrategias empleadas. Las tradicionales, se basan en la utilización de virus inactivados, vivos atenuados y proteínas virales. Las innovadoras por su parte emplean vectores virales y ácidos nucleicos. En todas ellas, la condición *sinequanon* tiene que ver con seguridad y eficacia. Logrado esto, prosigue la elaboración a gran escala a fin de producir un número de dosis capaz de concretar el objetivo de inmunidad colectiva.

El principal antígeno hacia el cual se busca generar una respuesta inmune es la proteína de la espícula (S) de SARS-CoV-2. Dentro de S, interesa fundamentalmente el dominio de unión al receptor -RBD- gracias al cual el virus consigue ingresar a las células por lo que constituye el blanco a neutralizar. Es importante contar con una proteína correctamente plegada. S es una proteína de fusión tipo 1 que debe sufrir un cambio conformacional a fin de conseguir la unificación de membranas (del virus con la célula). La forma prefusión de la proteína S parece ser la que provoca una mejor respuesta inmune y así se han generado formas más estables en el dominio S2 de esta proteína (involucrado en el proceso de fusión).

La proteína nucleocápside (N) del COVID-19 también es inmunogénica atento a que induce una abundante producción de anticuerpos con una vida media más larga respecto de los dirigidos hacia S. Algunos datos a nivel experimental sugieren que la inmunización con N podría relacionarse con enfermedad potenciada por vacuna. No está aclarado si la esta proteína es un inmunógeno protector potencial para el SARS-CoV-2, aunque los enfoques vacunales que utilizan virus completo -inactivado o vivo atenuado- suelen incluirla. Por fuera de esto, N tiene utilidad diagnóstica para la detección de personas infectadas en los ensayos de vacunas en fase III.

Plataformas empleadas: proteínas, virus inactivados, vacunas en base a vectores (vivos atenuados) y ácidos nucleicos
--

Este documento apunta a efectuar una descripción de los principales procedimientos y no una enumeración pormenorizada de los avances de cada vacuna. Para ello el lector interesado puede consultar la siguiente página

https://www.avac.org/sites/default/files/resource-files/COVID_Vax_Cheatsheet_Jan6_2021.pdf

Vacunas proteicas

Al igual que con otros patógenos, las proteínas de la superficie del virus sintetizadas por técnicas recombinantes pueden llegar a constituir vacunas seguras para COVID-19. Aunque estas tienen un buen perfil de inocuidad, generalmente se busca mejorar su eficacia en base al empleo de adyuvantes dado que los niveles de inmunogenicidad pueden ser subóptimos. Los genes que codifican para los antígenos elegidos se clonan/sintetizan, expresan y purifican utilizando una variedad de sistemas de expresión (bacterias, levaduras y células de insectos o mamíferos). Los sistemas bacterianos se utilizan a menudo porque tienen alta eficiencia y son fáciles de escalar. Sin embargo, para los antígenos virales, donde la modificación postraduccional puede ser importante, el uso de células de insectos o células de mamíferos es más aplicable.

Se están desarrollando varias vacunas proteicas contra el SARS-CoV-2 (varios ensayos clínicos en curso). Dos de los primeros en ser anunciados emplean la proteína S. La vacuna se administra junto con el adyuvante. La Universidad de Queensland ha desarrollado una vacuna recombinante de subunidad de la proteína S (en su conformación de prefusión). El laboratorio Sanofi está trabajando otra vacuna de subunidad proteica de SARS-CoV-2.

Nanopartículas y partículas similares a virus (*virus-like particles VLP*)

Las VLP constituyen un subconjunto de vacunas proteicas, nanopartículas producidas artificialmente las cuales se asemejan al virus. En lugar de una proteína individual, las VLP se elaboran para contener algunas o todas las proteínas constituyentes de la cápside viral. Obviamente que no contienen el material genético del virus, pero poseen algunas similitudes con las vacunas vivas atenuadas o inactivadas (en su composición antigénica). Ergo, pueden inducir una sustancial respuesta de anticuerpos. Se utilizan para una amplia gama de virus (por ejemplo, el papiloma humano). Novavax desarrolló una vacuna de nanopartículas recombinantes (NVX-CoV2373) que incluye la proteína S del SARS-CoV-2 (en base al empleo de un baculovirus que infecta células de insectos). La vacuna tiene potencial inmunogénico, pero requiere la adición de adyuvante para lograr el 100% de seroconversión; y se requieren dos dosis para promover la producción de anticuerpos neutralizantes en los inmunizados. Los modelos en animales desafiados con ella revelan la presencia de anticuerpos específicos hacia S que impiden la adhesión a los receptores ACE-2 de la célula hospedera a la par de neutralizar el virus silvestre. Otra compañía está usando un sistema a base de plantas para producir un VLP la cual se está estudiando en función de la administración conjunta con adyuvante CpG o AS03¹.

Vacunas peptídicas

La vacunación con péptidos parte del concepto que la inclusión de un número necesario de péptidos inmunogénicos deriva en la inducción de respuestas de linfocitos T. Basado en la selección de epitopes conservados, estas vacunas podrían generar una inmunidad de amplio espectro contra distintas cepas de un patógeno en cuestión. Los péptidos son más fáciles de producir que los antígenos proteicos enteros, ya que se lo hace sintéticamente y no requieren el plegado a una estructura terciaria (que sí es necesario para el caso de una proteína). El punto es que las vacunas de péptidos frecuentemente son poco inmunogénicas, en parte debido al tamaño relativamente reducido de estos y cuestiones que tienen que ver con el procesamiento/presentación del antígeno por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Para paliar (en parte) esta limitación se puede recurrir a proteínas “*carriers*” o adyuvantes. Varios laboratorios están analizando la posibilidad de desarrollar vacunas de péptidos para SARS-CoV-2.

Vacunas inactivadas

Uno de los métodos más clásicos en la preparación de vacunas tiene que ver con la obtención e inactivación de un virus (formaldehído). Para el caso de SARS-CoV-1 y MERS-CoV, la realización de este tipo de estrategias ha permitido constatar la presencia de patología pulmonar en animales vacunados con MERS-CoV sometidos a radiación gamma y SARS-CoV-1 inactivado por radiación UV. La elección tanto del adyuvante como el proceso de inactivación es relevante para modelar la respuesta inmune, como lo demuestra el hecho que la inactivación de MERS-CoV con formaldehído y la utilización de aluminio y CpG como adyuvante deriva en una vacuna experimental con un importante grado de protección sin inducción de daño relacionada con ella. De momento se cuenta con cuatro vacunas inactivadas en ensayos clínicos. Sinovac Biotech está utilizando una plataforma ya empleada para SARS-CoV-1. El virus se cultiva en células Vero e inactiva con beta-propiolactona. La vacuna fue segura e inmunogénica en monos Rhesus quienes mostraron una gran protección ante el desafío de SARS-CoV-2 (no se detectó virus en la faringe o los pulmones). Existen dos versiones diferentes de esta vacuna: mediante el agregado de adyuvante con aluminio o bien CpG 108. Esta vacuna ha completado un ensayo de fase II en 600 adultos sanos (18 a 59 años, NCT04352608), con seroconversión en el 90% de los casos tras

¹ CpG: secuencias de ADN que contienen pares de citosina guanina no metilado las cuales ejercen una fuerte estimulación del sistema inmune. Dentro de los adyuvantes oleosos (emulsiones) a base de escualeno en vacunas se utilizan dos: el MF59 y el AS03.

la segunda dosis y también se detectaron anticuerpos neutralizantes. Es de destacar que el método de producción del virus fue cambiado a fin de conseguir mayor inmunogenicidad. Se están efectuando ensayos clínicos de fase III, próximos a concluir, en Brasil (NCT04456595) e Indonesia (NCT04508075).

Sinopharm, en colaboración con el Instituto de Beijing de Productos biológicos y el Instituto de Biología de Wuhan, también ha desarrollado una vacuna inactivada y se están llevando a cabo los ensayos clínicos para su licencia. No se observaron efectos adversos serios, y más del 95% de los individuos seroconvirtieron con anticuerpos neutralizantes detectables en los dos diferentes ensayos. Los anticuerpos se observaron principalmente después de la segunda dosis.

Por su parte, Bharat Biotech (India) y el Instituto de Biología Médica/Academia China de Ciencias Médicas, están realizando ensayos clínicos de vacunas inactivadas. Valneva, con sede en Escocia, por su parte está trabajando para la obtención de una vacuna inactivada con formaldehído con CpG como adyuvante.

Vacunas vivas

El uso de un virus vivo para prevenir la infección constituye el enfoque de vacunación más tradicional. Las plataformas de vacunas de virus vivos consisten en: atenuación del virus o empleo de un vector viral transgénico.

Vacunas vivas atenuadas

Las vacunas vivas atenuadas intentan remedar la infección natural y por ende apuntan a ser bien inmunogénicas como para requerir una única dosis y sin adyuvante. Históricamente, se ha utilizado el pasaje en serie para su atenuación (en el caso de la vacuna para fiebre amarilla fueron más de 200 veces). Alternativamente, se pueden generar virus atenuados por genética inversa, es decir introduciendo mutaciones dirigidas a un sitio en los genes asociados con la virulencia. Sin embargo, este método requiere la identificación de genes que reducirían la replicación viral y que la(s) mutación (es) insertada(s) sean fenotípicamente estables. Codagenix y el Serum Institute de la India están desarrollando una vacuna de virus SARS-CoV-2 vivo atenuado con una técnica más novedosa sobre experiencias previas con el virus sincicial respiratorio (VSR) e influenza.

Vacunas por vectores

En este tipo de vacunas, el gen para el antígeno de interés es expresado en otro microorganismo, ya sea virus o bacterias. Algunos de los que se pueden utilizar son los adenovirus, virus de la estomatitis vesicular y el virus vaccinia ANKARA modificado. Los vectores que acarrean el gen para el antígeno en cuestión pueden ser deficientes en replicación o capaces de hacerlo, precisamente en el sitio donde se inmuniza. Los diferentes vectores pueden alterar la reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna. Es importante destacar, además, que la inmunidad preexistente contra un adenovirus humano puede restringir su aplicabilidad clínica como vector, con lo cual se puede utilizar un adenovirus de chimpancé.

Actualmente se encuentran disponibles cinco vacunas con vectores virales en ensayos clínicos. Los vectores adenovirales de replicación deficiente carecen de los genes esenciales para la reproducción del virus, y así pueden brindar la información para la síntesis del antígeno sin replicarse en el individuo vacunado. Basándose en la experiencia con MERS-CoV, la Universidad de Oxford ha desarrollado una vacuna con el adenovirus de chimpancé como vector que expresa la proteína S de tipo silvestre (ChAdOx1nCov-19, también conocido como AZD1222). La vacuna AZD1222 Cansino Biologics (China) también es un Ad5-vacuna vectorizada. Teóricamente en breve se dispondrán de los resultados correspondientes a la fase III de esta última.

Johnson y Johnson está usando un vector de adenovirus deficiente para la replicación (AdVac®). Esta plataforma se ha utilizado en vacunas candidatas para el Zika, el VSR y el VIH. En las estrategias para controlar el Ebola, también se utilizó una vacuna (Ad26.ZEBOV) que utiliza la misma plataforma la cual ha demostrado ser segura e inmunogénica. Otra vacuna vectorizada

es la del Instituto de Investigación Gamaleya, que ha recibido el nombre comercial Sputnik V. Esta vacuna utiliza dos vectores de adenovirus diferentes, Ad26 y Ad5. A la fecha, se han registrado dos ensayos clínicos (fase I/II) en los que fue administrada individualmente o como prime-boost, ya sea como solución o formulación liofilizada en un total de 75 personas. El ensayo registró efectos sistémicos leves a moderados y efectos locales leves, incluido el dolor en el lugar de la inyección; 100% en la tasa de seroconversión mediante ELISA. También hubo algunos anticuerpos anti-vector detectados después de la inmunización. Es de esperar que en breve tengamos más datos sobre la fase II y un análisis interino de la fase III.

Una alternativa al vector de replicación deficiente es utilizar un vector vivo atenuado. Merck (Themis), desarrolló una vacuna de este tipo vía de una cepa atenuada del virus del sarampión derivada de la cepa de vacuna original de 1954. En colaboración con el Institut Pasteur y la Universidad de Pittsburgh se están llevando a cabo ensayos clínicos con la misma.

Administración de vacunas por vectores en las mucosas

Las vacunas vivas por vectores pueden prestarse a inmunización vía mucosas que puede lograr una mejor inmunidad local como ya ha sido utilizado en otros casos (vacuna intranasal viva atenuada contra la influenza). El entusiasmo de los datos preclínicos con estas vacunas mucosales no siempre se reflejó en el éxito clínico esperado. Beijing Wantai Biological Pharmacy y la Universidad de Xiamen están trabajando en esta dirección utilizando un vector viral del virus de la gripe.

Vacunas de ácidos nucleicos

Las vacunas de ácidos nucleicos pueden ser útiles en la pandemia debido a su bajo costo y más rápido desarrollo. Utilizan ADN o ARN, que llevan la información para la síntesis del antígeno diana. Después de la administración de la vacuna, el ácido nucleico es captado por las células y el código provisto lleva a la síntesis del antígeno. Existen varias plataformas de ARN y ADN en estudio.

Vacunas de ADN

La mayoría de las vacunas de ADN se elaboran a partir de plásmidos que contienen secuencias procariotas las cuales permiten su producción en la bacteria *Escherichia coli*, y un sistema que controla la expresión del transgen blanco en la persona vacunada. Tras la administración, la vacuna de ADN es captada por las células del hospedero en el sitio de inmunización o bien mediante células presentadoras de antígenos (CPA) presentes allí. Para inducir la respuesta inmune adaptativa el ADN debe entrar en el núcleo celular. En su tránsito hacia el núcleo, el ADN pasa a través del citosol, y es detectado por receptores de reconocimiento de patrones intracelulares, induciendo una respuesta de inmunidad innata. La activación de la inmunidad innata es esencial para promover el desarrollo subsiguiente de la inmunidad adaptativa a estas vacunas. Si las CPA se transfectaran directamente con una vacuna de ADN, acarrearían los péptidos (codificados por ella) en las moléculas del CMH para activar a los linfocitos T. Más allá de estas disquisiciones las células con el ADN en su interior generarán el antígeno, el cual será captado por CPA y asimismo reconocido por los linfocitos B. Como el tránsito al núcleo del ADN es bastante ineficiente, este tipo de plataformas emplean sistemas de entrega que apuntan a mejorar ese paso, como la electroporación.

La vacuna Inovio MERS INO4700 (GLS-5300) red denominada INO-4800 está siendo estudiada en su capacidad de proteger contra el SARS-CoV-2 (fases clínicas iniciales). En estudios preclínicos de INO-4800, se observaron anticuerpos neutralizantes y respuestas de linfocitos T en ratones como así también la presencia de anticuerpos bloqueantes en cobayos y monos vacunados. Hay otros estudios de vacunas por ADN en Corea del Sur, India y Japón.

Vacunas de ARN

Las vacunas de ARN se basan en la misma premisa que el ADN, es decir que se produzca el antígeno vacunal en la célula hospedera, pero aquí se omite el paso de transcripción (de ADN a ARN). A diferencia de las vacunas ADN, la expresión de la vacuna por ARN comienza una vez que este ingresa en el citosol celular. La presencia de ARN "extraño" se detecta tanto en el endosoma como en el citosol, lo cual le otorga un efecto autoadyuvante. Sin embargo, la activación temprana de respuestas que llevan a la producción de interferón tipo I (alfa y beta) puede regular a la baja la expresión de proteínas. Se pueden incorporar nucleósidos modificados en el ARN para crear una vacuna de ARN "silenciada" que no active una respuesta de IFN tipo I, pero hay que balancear la posibilidad que ello no resulte paralelamente en menor inmunogenicidad. Hay dos tipos principales de ARN mensajeros para este tipo de vacuna, ARNm y ARNm autoamplificador (ARNa). Estas vacunas (no replicantes) son construcciones diseñadas que codifican el producto de interés.

Por tratarse de una tecnología más novedosa no existían antecedentes de estas vacunas contra el SARS-CoV-1. Se están estudiando varias vacunas de ARN. Moderna con el NIH y el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas han publicado los estudios de fase III. Pfizer BioNTech también han concluido los estudios de fase III. CureVac asimismo ha elaborado una vacuna de ARNm que está siendo estudiada actualmente. El Imperial College London y su empresa derivada, VacEquity Global Health, están desarrollando otra variedad de vacuna ARN que codifica la proteína S. ARCTURUS, con sede en Singapur, por su parte está trabajando con una vacuna de ARNa que codifica para la proteína S de prefusión.

Vacuna BCG

Varios estudios han demostrado que la BCG induce asimismo un importante grado de protección inespecífica contra enfermedades no relacionadas con la Tuberculosis. La administración temprana de BCG reduce la mortalidad infantil en aproximadamente 38% -45%, principalmente como resultado de disminución de la sepsis neonatal, las infecciones respiratorias y la fiebre. Los efectos inespecíficos de esta vacuna no se limitan a los niños, ya que la calmetización en adolescentes conduce a una disminución del 70% en la incidencia de infecciones del tracto respiratorio, y los vacunados con BCG de edad avanzada (60 a 75 años) también experimentan menos infecciones respiratorias. Estos efectos heterólogos beneficiosos de la vacuna están mediados por una mejora de la respuesta inmune innata (especie de memoria inmune innata), también conocido como inmunidad entrenada. Atento a ello varias iniciativas a lo largo del mundo están tratando de determinar la eventual acción protectora de BCG en COVID-19.

Pros y contras de las diferentes plataformas

Cada uno de los enfoques tiene ventajas y desventajas, y el balance final se conocerá a través de los estudios clínicos de eficacia y seguridad. Las vacunas vivas atenuadas tienen una larga trayectoria en estos aspectos, pero pueden no ser factibles en la pandemia actual debido al tiempo que lleva generar un producto "candidato atenuado" eficaz. Las vacunas inactivadas también tienen un largo historial de eficacia protectora, sumado a la ventaja de que son bastante rápidas de generar; sin embargo, requieren una alta capacidad instalada para generar el "stock" de virus a inactivar. Allí también surgió en su momento alguna preocupación sobre una eventual generación de daño inmunopatológico inducido por vacunas, como se había visto para algunos otros virus respiratorios o en estudios preclínicos en SARS-CoV-1. De momento no pareciera ser el caso de las vacunas inactivadas contra el SARS-CoV-2. La respuesta definitiva la tendremos tras la realización de estudios clínicos a gran escala y seguimientos más prolongados pero los datos son alentadores. Las vacunas de proteínas recombinantes han estado en uso desde la década de 1980; están dirigidas a un antígeno bien específico. Aquellas que proponen una proteína candidata podrían tener una vía más rápida para su licencia, ya que es una estrategia más conocida. El reto aquí es utilizar la conformación correcta de la proteína S, la cual puede ser menos protectora en el caso de emplearse la forma post-fusión.

Las vacunas a ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN, tienen mucho potencial en términos de velocidad de respuesta, y la pandemia está poniendo a prueba sus potenciales beneficios. Las vacunas de ADN parecen ser menos inmunogénicas que otras plataformas, aunque con dispositivos de administración alternativos se las podría mejorar. Las vacunas de ARN no tienen antecedentes y requiere un almacenamiento a temperaturas extremadamente bajas. Las vacunas con vectores virales están en plena investigación. Parecen ser seguras, pero pueden ser reactogénicas cuando se aumenta la dosis. En el caso de los adenovirus volvemos sobre el tema de la inmunidad preexistente contra el vector, especialmente cuando se emplea un virus humano.

En líneas generales todas las vacunas parecen ser inmunogénicas, aunque la comparación en sintonía fina es difícil, ya los protocolos de los diferentes ensayos clínicos tienen sus propias particularidades. La eficacia de la vacuna en un ensayo clínico aleatorizado es crucial, pero los puntos finales primarios suelen diferir, algunos estudios buscan la reducción de la enfermedad, mientras que otros apuntan a la reducción de infecciones confirmadas. Todo esto es importante a la hora de extraer conclusiones.

Lectura Recomendada

- Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* 2013, 34: 431–439.
- Connors M, Graham BS, Clifford Lane H, Fauci AS. SARS-CoV-2 Vaccines: Much Accomplished, Much to Learn. *Ann Intern Med* 2021 Jan 19. doi: 10.7326/M21-0111.
- Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis* 2020, Oct 27; S1473-3099(20)30773-8. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30773-8.
- Iwasaki A, Omer SB. Why and How Vaccines Work. *Cell* 2020, 183: 290-295. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.040.
- Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.* 2020, 586(7830):516-527. doi: 10.1038/s41586-020-2798-3
- Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JWM, Mhlanga MM, Mulder WJM, Riksen NP, Schlitzer A, Schultze JL, Stabell Benn C, Sun JC, Xavier RJ, Latz E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020, 20:375-388. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6.
- O'Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat Rev Immunol.* 2020, 20: 335-337. doi: 10.1038/s41577-020-0337-y
- Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol* 2020 Dec 22;1-18. doi: 10.1038/s41577-020-00479-7.
- Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm NM, Pierce BF, Stirling DC, Wang Z, Pollock KM. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol.* 2020, 202: 162-192. doi: 10.1111/cei.13517.
- <https://www.avac.org/resource/cheat-sheet-covid-19-vaccine-pipeline>