

# ARVAC

PRIMERA VACUNA PROTEICA  
CONTRA COVID-19

## MONOGRAFÍA DE PRODUCTO

  
**Cassará**

Vocación científica. Compromiso social.



# ARVAC

PRIMERA VACUNA PROTEICA CONTRA COVID-19





La presente Monografía de Producto es un documento reducido, que resume el Dossier de Registro original de ARVAC que consta de **3092 páginas** presentado a las autoridades sanitarias.

## INDICE

1. Introducción. *Página 3*
2. Resumen del tipo de vacuna. *Página 6*
3. Resumen de fórmula estructural, molecular y masa molecular relativa del principio activo. *Página 8*
4. Resumen de Caracterización del principio activo. *Página 9*
5. Resumen del proceso de fabricación del principio activo. *Página 41*
6. Resumen de proceso de producción del producto terminado. *Página 44*
7. Resumen de metodología y especificaciones de calidad del principio activo. *Página 45*
8. Resumen de metodología y especificaciones de calidad del producto terminado. *Página 47*
9. Resumen de estabilidad del producto terminado. *Página 48*
10. Resumen de ensayos de inmunogenicidad en ratones. *Página 49*
11. Resumen de desarrollo no clínico toxicidad. *Página 57*
12. Resumen de desarrollo clínico. *Página 60*



## 1. INTRODUCCIÓN

El coronavirus de tipo 2, causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es un coronavirus altamente transmisible y patógeno que surgió a fines de 2019 y ha causado una pandemia de enfermedad respiratoria aguda, denominada Enfermedad por Coronavirus 2019, (COVID-19) constituyendo una amenaza para la salud de los seres humanos.

A fines de diciembre de 2019, varios establecimientos de salud en Wuhan, en la provincia de Hubei, China, informaron sobre grupos de pacientes con neumonía de causa desconocida<sup>1</sup>. De manera similar a los pacientes con Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS) y Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), estos pacientes mostraron síntomas de neumonía viral, que incluían fiebre, tos y malestar en el pecho y, en casos graves, disnea e infiltración pulmonar bilateral<sup>1, 2</sup>.

Entre los primeros 27 pacientes hospitalizados documentados, la mayoría de los casos fueron epidemiológicamente vinculados al mercado mayorista de mariscos de Huanan, un mercado húmedo ubicado en el centro de Wuhan, que comercializaba no solo mariscos, sino también animales vivos, incluidas aves de corral y animales silvestres. Según un estudio retrospectivo, el inicio del primer caso conocido se remonta al 8 de diciembre de 2019<sup>3</sup>. El 31 de diciembre los oficiales de Salud Municipal de Wuhan notificaron sobre un brote de neumonía de causa no identificada y la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo informó al mundo<sup>3</sup>.

El 11 de marzo de 2020, la OMS definió a la COVID-19 como una pandemia. Desde entonces se han realizado importantes esfuerzos globales para desarrollar vacunas contra la COVID-19 utilizando diferentes plataformas de vacunas, incluyendo vacunas basadas en virus inactivados, ácidos nucleicos (ADN y ARN), vectores virales y vacunas a subunidad basadas en proteínas recombinantes incluyendo la proteína espiga (Spike) y la porción de la proteína espiga llamada RBD. Asimismo, el virus fue mutando y se fueron haciendo prevalentes diferentes variantes denominadas con letras griegas tales como: Beta, Delta, Gamma, Ómicron y han aparecido también subvariantes de Ómicron tales como Ómicron BA.1, Ómicron BA.5, Omicron XBB.1.5; la variante ancestral se denomina generalmente “Wuhan” por el lugar donde fue notificado por primera vez.

En nuestro país un equipo integrado por investigadores del CONICET en la Universidad Nacional de San Martín e investigadores del Laboratorio Pablo Cassará S.R.L. han desarrollado la vacuna ARVAC, una vacuna contra el SARS-CoV-2, de subunidad proteica con un antígeno recombinante.

ARVAC es una vacuna contra el SARS-CoV-2 de subunidad proteica que contiene un antígeno recombinante que en su estructura incluye una porción de la proteína espiga (Spike) del virus, denominada “dominio de unión al receptor” o, en inglés “*receptor binding domain*” (RBD). El RBD es el sitio que se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (hACE2) para mediar la infección viral. Por ello, la mayoría de los anticuerpos neutralizantes reconocen a RBD<sup>9,10,11,12</sup> y esto lo hace un blanco atractivo como antígeno de diseño de vacunas a subunidad contra el SARS-CoV-2. De hecho, las vacunas recombinantes ya aprobadas en el mundo y las de ARN mensajero basan su eficacia en el título de anticuerpos neutralizantes contra este antígeno.

Comparadas con las vacunas de ARN mensajero que desempeñaron un papel importante en la mitigación de los efectos de la pandemia en EE. UU. y gran parte de Europa, las vacunas de subunidades basadas en proteínas recombinantes son más estables y menos dependientes de la cadena de frío, lo que las hace más económicas, fáciles de producir y de distribuir en todo el mundo. Por otra parte la tecnología de proteínas recombinantes ha sido ampliamente estudiada y utilizada en vacunas desde hace más de tres décadas, como es el caso de la



vacuna contra la hepatitis B que se aplica en niños recién nacidos, comprobándose su excelente tolerancia y seguridad a largo plazo. Las vacunas a subunidades presentan antecedentes de seguridad comprobada y se recomiendan para poblaciones de todas las edades, embarazadas e inmunodeprimidos.

A nivel productivo, Argentina cuenta con plantas habilitadas con capacidad de producción de proteínas recombinantes.

El diseño de ARVAC con antígeno proteico recombinante basado en RBD y el adyuvante convencional hidróxido de aluminio permitió desarrollar una vacuna estable entre 2 y 8°C y vacuna segura para utilizarse como refuerzo a repetición.

Habiéndose completado exitosamente los estudios clínicos multicéntricos de Fase I y II/III, se ha registrado ARVAC en su versión Gamma bajo el certificado Nro. 59.957 conteniendo 50 µg de antígeno RBDscd de la variante Gamma cada 0,5 mL como vacuna de refuerzo para personas de 18 a 60 años con un esquema previo completo de vacunación contra SARS-CoV-2. También se halla registrada y autorizada para comercializar la versión bivalente de ARVAC como una extensión del mismo certificado como vacuna de refuerzo para personas de 18 años en adelante que tengan un esquema completo de vacunación primaria contra SARS-CoV-2. Esta versión bivalente contiene 25 µg de RBDscd variante Gamma y 25 µg de RBDscd variante Ómicron BA.4/5.



## 2. RESUMEN DEL TIPO DE VACUNA

La vacuna ARVAC es una suspensión inyectable del antígeno RBDscd adyuvado con hidróxido de aluminio. Se presenta como una suspensión estéril que se resuspende fácilmente, de aspecto blanquecino, libre de partículas, formulada a pH 6,8 – 7,4. Ha sido autorizada como vacuna de refuerzo contra COVID-19 en personas de 18 a 60 años que ya tienen un esquema completo de vacunación primaria contra SARS-CoV-2.

### VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Intramuscular.

### PRESENTACIONES

- Frasco ampolla x 0,5 mL.
- Ampolla x 0,5 mL
- Frasco ampolla multidosis conteniendo 10 dosis x 0,5 mL.

### COMPOSICIÓN

Cada dosis de Vacuna ARVAC contiene:

Antígeno RBDscd Gamma 25 µg

Antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 25 µg

Gel de Hidróxido de Aluminio 0,5 mg Al Adyuvante BP 2019

Fosfato sódico anhidro 0,090 mg Regulador del pH USP 41 NF 36

Fosfato disódico anhidro 0,071 mg Regulador del pH USP 41 NF 36

Cloruro de sodio 0,730 mg Isotonizante USP 43 NF 38

L-Histidina 0,582 mg Regulador del pH BP 2019

Manitol 20,05 mg Isotonizante USP 36 NF 31

Agua para inyectables c.s.p. 0,5 mL Vehículo USP 43 NF 38

### MECANISMO DE ACCIÓN INMUNOLÓGICA

La vacuna ARVAC contra COVID-19 de subunidad proteica contiene dos antígenos proteicos que incluyen la parte de la proteína espiga del virus SARS-CoV-2 denominada RBD (Dominio de Unión al Receptor). Estos antígenos se producen por medio de tecnología de ADN recombinante usando un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) en las que se ha incorporado el gen que codifica el antígeno, que luego se aísla y purifica.

Esta parte de la proteína espiga se une a un receptor en las células humanas y le permite al virus ingresar en ellas y replicarse provocando la enfermedad infecciosa COVID-19. Al exponer al organismo humano a esta proteína mediante la aplicación de esta vacuna, el sistema inmune refuerza la inmunidad específica contra el virus SARS-CoV-2 obtenida por una vacunación previa. El mecanismo de acción consiste en bloquear la capacidad de unión de la porción RBD de la proteína espiga al receptor que utiliza el virus para ingresar a la célula, lo cual imposibilita la replicación viral.

En la vacuna los antígenos están adsorbidos sobre hidróxido de aluminio como adyuvante, para intensificar su acción inmunogénica.



## INDICACIÓN

ARVAC es una vacuna de subunidad proteica recombinante de administración intramuscular para la indicación de refuerzo de esquemas de vacunación contra COVID-19 en personas de 18 años de edad y mayores que ya han recibido un esquema completo de vacunación primaria contra esta enfermedad.

## NOMBRE DEL PRINCIPIO ACTIVO

Antígeno de superficie recombinante del virus SARS-CoV-2 (Dominio de unión al receptor de la proteína de superficie espiga, variante Gamma).

Se trata de una solución concentrada de glicoproteína con la secuencia primaria de un dímero de cadena única en tándem, correspondiente al dominio de unión al receptor de la proteína Spike (espiga) del virus SARS-CoV-2, Variante Gamma (Antígeno RBDscd Gamma) obtenida por medio de técnicas de ADN recombinante.

Antígeno de superficie recombinante del virus SARS-CoV-2 (Dominio de unión al receptor de la proteína de superficie espiga, Variante Ómicron BA.4/5).

Se trata de una solución concentrada de glicoproteínas estrechamente relacionadas del dímero de cadena única del dominio de unión al receptor de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2, Variante Omicron BA.4/5 (Antígeno RBDscd Ómicron).



## 3. RESUMEN DE FÓRMULA ESTRUCTURAL, MOLECULAR Y MASA MOLECULAR RELATIVA DEL PRINCIPIO ACTIVO

Antígeno RBDscd Gamma: La secuencia de la glicoproteína que constituye el antígeno RBDscd Gamma contiene los aminoácidos 319R – 537K de la proteína S (Spike) de la variante Gamma de virus SARS-CoV-2 (Variante: 20J, Gamma, V3; inicialmente identificada en la ciudad de Manaus, Brasil), localizados en el dominio C-terminal de la subunidad S1. Este dominio se une a la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (hACE2) para permitir el ingreso del virus a las células humanas. La glicoproteína madura (sin péptido señal) está constituida por 438 aminoácidos (AA) conectados entre sí, formando una única cadena polipeptídica cuya fórmula molecular es  $C_{2234}H_{3366}N_{588}O_{645}S_{16}$  y que posee las siguientes características estructurales:

- La cadena polipeptídica posee un peso molecular de 49,3 kDa
- Aminoácidos terminales: pyroQ (piro glutamina) N terminal como aminoácido adicional y K (lisina) C-terminal truncada.
- Posee 8 puentes disulfuro correctamente formados, siendo el % de Cys libres  $\leq 2\%$ .
- Posee 6 sitios de glicosilación: 4 (cuatro) N-glicosilaciones: Asn13, Asn25, Asn232, Asn244 y 2 sitios de O-glicosilación: Thr5 y Thr224.
- Se evidenció O-glicosilación completa.
- El peso molecular de la proteína N-deglicosilada evidenció 2 especies mayoritarias con un peso molecular estimado de 50,6 y 50,9kDa. La diferencia entre ambos pesos moleculares corresponde a las 2 especies de O-glicanos mayoritarias: Hex2HexNAc2NeuAc2 y Hex2HexNAc2NeuAc3.

Antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5: La glicoproteína madura (sin péptido señal) está constituida por 438 aminoácidos (AA) conectados entre sí, formando una única cadena polipeptídica cuya fórmula molecular es  $C_{2250}H_{3388}N_{602}O_{633}S_{16}$  y que posee las siguientes características estructurales:

El análisis de puentes disulfuro por LC-ESI-MS y MS-MS confirmó la presencia de los 8 puentes disulfuro correctamente formados, siendo el % de Cys libres  $\leq 0,4\%$ .

Posee 6 sitios de glicosilación: 4 (cuatro) N-glicosilaciones: Asn13, Asn25, Asn232, Asn244 y 2 sitios de O-glicosilación: Thr5 y Thr224.

La caracterización estructural y la determinación del peso molecular por LC/ESI/MS y MS/MS evidenció O-glicosilación completa. El peso molecular de la proteína N-deglicosilada por espectrometría de masas muestra una especie mayoritaria con un peso molecular estimado de 50,8 kDa (kilodaltons). La cadena polipeptídica posee un peso molecular de 49,5kDa. La diferencia entre ambos pesos moleculares corresponde a la forma más abundante de O-glicosilación en ambos sitios juntos: Hex2HexNAc4NeuAc1.



## 4. RESUMEN DE CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Los principios activos son los antígenos de subunidad proteica RBDscd de las variantes Gamma y Ómicron BA.4/5. En ambos casos se trata de una proteína glicosilada producida en células de ovario de hámster chino (CHO) que incluye la forma dimérica de simple cadena del dominio de unión al receptor de la proteína Spike del virus Sars-CoV-2 con las mutaciones presentes en las variantes Gamma y Ómicron BA.4/5, desde el aminoácido 319 hasta el aminoácido 537.

Ambos principios activos fueron caracterizados usando ensayos para asegurar la estructura primaria, estructuras de órdenes superiores, propiedades inmunológicas y biológicas e impurezas.

### 4.1 ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

Ambos antígenos son glicoproteínas básicas que poseen 438 aminoácidos (AA), entre ellos 16 cisteínas que forman 8 puentes di-sulfuro intra-moleculares teóricos.

Poseen 4 sitios de N-glicosilación teóricos: Asn13, Asn25, Asn232, Asn244 y 2 sitios de O-glicosilación: Thr5 y Th224. Hay evidencia que sugiere que la glicosilación está involucrada en la unión al receptor, ya sea de manera directa o como estabilizante de la conformación (Gstöttner et al., 2021).

#### Secuencia primaria de RBDscd Gamma

RVQPTESIVR	FPNITNLCPF	GEVFNATRF	SVYAWNKRRI	SNCVADYSVL	YNSASFSTFK
10	20	30	40	50	60
CYGVSPTKLN	DLCFTNVYAD	SFVIRGDEV	QIAPGQTGTI	ADYNYKLPDD	FTGCVIAWNS
70	80	90	100	110	120
NNLDSKVGGN	YNYLYRLFRK	SNLKPFERDI	STEIYQAGST	PCNGVKGFNC	YFPLQSYGFQ
130	140	150	160	170	180
PTYGVGYQPY	RVVVLSFELL	HAPATVCGPK	KSTNLVKNKR	VQPTESIVRF	PNITNLCPF
190	200	210	220	230	240
EVFNATRFAS	VYAWNKRKIS	NCVADYSVLY	NSASFSTFKC	YGVSPTKLND	LCFTNVYADS
250	260	270	280	290	300
FVIRGDEV	IAPGQTGTIA	DYNYKLPDD	TGCVIAWNSN	NLDSKVGGN	NYLYRLFRKS
310	320	330	340	350	360
NLKPFERDIS	TEIYQAGSTP	CNGVKGFNCY	FPLQSYGFQP	TYGVGYQPYR	VVLSFELLH
370	380	390	400	410	420
430	APATVCGPKK STNLVKNK				

Figura 1.4. Secuencia teórica de aminoácidos de RBDscd Gamma



### Secuencia primaria de RBDscd Ómicron BA.4/5

```

10      20      30      40      50      60
RVQPTE1ESIVR FPNIT2NLC3PF DEVEN4NAT5RFA SVYAWNRKRI SNCVADYSVL YNFAPFFAFK
70      80      90      100     110     120
CYGVSP6TKLN7 DLCFTNVYAD8 SFVIRGNEVS9 QIAPGQTGNI10 ADYNYKLPDD11 FTGCVIAWNS12
130     140     150     160     170     180
NKLDSK13VGGN14 YNYRYRLFRK15 SNLKP16FERDI17 STEIYQAGNK18 PCNGVAGVNC19 YFPLQSYGFR20
190     200     210     220     230     240
PTYGVGHQ21PY22 RVVLSFELL23 HAPATVCGPK24 KSTNLVKNKR25 VQPTE26ESIVR27 FPNIT28NLC29PF30D
250     260     270     280     290     300
EVFNAT31RFAS32 VYAWNRKRIS33 NCVADYSVL34Y NFAPFFAFK35C YGVSP36TKLN37D LCFTNVYAD38S
310     320     330     340     350     360
FVIRGNEVS39Q IAPGQTGNI40A DYNKLPDD41F TGCVIAWNS42N KLDSK43VGGN44Y NYRYRLFRK45S
370     380     390     400     410     420
NLKPFERDI46S TEIYQAGNK47P CNGVAGVNC48Y FPLQSYGFR49P TYGVGHQ50PY51R VVLSFELL52H
430
APATVCGPK53K STNLVKNK54
    
```

**Figura 2.4-Secuencia teórica de aminoácidos de RBDscd Ómicron BA.4/5**

La elucidación de la estructura primaria de ambos antígenos (Principios Activos) fue determinada según se resume en la **Tabla 1.4**

ITEM	ESTUDIO/METODOLOGÍA	ABORDAJE	RESULTADO	OBSERVACIONES
1.1	Secuenciación del ácido nucleico correspondiente al ARN mensajero codificante para RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5	Indirecto	100% de homología de la región codificante.	Estudio realizado sobre el clon dRBD-OP/M6L 709 productor del antígeno RBDscd Gamma y el clon dRBD-OBA4.5/319 -658, productor del antígeno Ómicron BA.4/5
1.2	Determinación del PM relativo por SDS PAGE	Directo	PM de la banda principal.	PM relativo
1.3	Secuencia de AA por digestión con enzimas proteolíticas del antígeno reducido y análisis de los fragmentos por LC-ESI-MS y MS/MS	Directo	100% de cobertura de la secuencia de AA.	Modificaciones post-traduccionales: O-glicosilación completa, Lys C-terminal truncada..
1.4	Determinación del PM sobre la proteína N-deglicosilada por LC-ESI-MS.	Directo	Confirmación de la secuencia de AA.	PM compatible con las modificaciones post-traduccionales obtenidas en 1.3.

**Tabla 1.4-Elucidación de la Estructura Primaria del antígeno RBDscd Gamma (Principio Activo)**



#### 4.1.1 SECUENCIACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO CORRESPONDIENTE AL ARN MENSAJERO CODIFICANTE RBDSCD GAMMA.

La identidad del clon dBBD-OP/M6L 709 a nivel de secuencia nucleotídica del ARNm fue verificada por transcripción reversa (RT-PCR) y secuenciación nucleotídica del ADN complementario (cDNA).

La secuencia consenso obtenida se detalla en la *Figura 4.4*

```
5' GTTTCTAGTGCTACTACCCTAGTGTCTCTCAGAGAGTGCAACCAACCGAGTCCATCGTGCGGTTCCCTAAC
ATCACCAACCTGTGTCTTTTGGCGAGGTGTTCAACGCCACCAGATTGCGCTCCGTGTACGCTGGAACCGGAAG
AGAATCTCCAACCTGTGTGGCTGACTACTCCGTGCTGTACAACCTCTGCTTCTTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGC
GTGTCTCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTACAAACGTGTACGCCGACTCCTTCGTGATCAGAGGCGACGAA
GTGAGACAGATCGCCCCCTGGACAGACCGGCACCATCGCGGATTACAACCTACAAGCTGCCTGATGACTTCACCGGC
TGTGTCAATTGCCTGGAATCCAACAACCTGGACTCTAAAGTGGGCGGCAACTACAACCTATCTGTACAGACTGTTT
CGGAAGTCCAACCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCTACCGAGATCTATCAGGCCGGATCTACCCCTTGCAAC
GGCGTTAAGGGCTTCAACTGCTACTTTCTCTGCAGTCTTACGGTTTCCAGCCTACCTACGGCGTGGGATAACCAG
CCTTACAGAGTGGTGGTGTCTTTTTGAACTGCTGCACGCCCTGCCACCGTGTGTGGCCCTAAGAAGTCCACC
AACCTGGTCAAGAACAAGAGAGTGCAGCCTACCGAGTCTATCGTGCGCTTTCCAAACATCACAACTTGTGCCCT
TTCGGCGAAGTGTTCAACGCTACCAGGTTTCGCTTCTGTGTACGCTTGGAAACAGAAAAGCGGATCAGCAACTGCGTG
GCCGACTACTCTGTGCTGTACAATCCGCCAGCTTTCAGCACCTTCAAGTGCTATGGCGTGAGCCCCACCAAGCTG
AACGATCTCTGCTTACAAATGTGTACGCCGACTCCTTCGTGATCCGGGGCGACGAGGTGCGGCAGATCGCTCCT
GGGCAGACCGGCACCATCGCCGACTACAATTACAAGCTGCCTGACGACTTACCCGGCTGTGTGATCGCTTGGAAC
TCCAACAACCTGGATTCCAAGGTGGGCGGAACTACAACCTACCTGTACCCGGCTGTTTCAAAAATCCAATCTGAAG
CCTTTTGAGAGAGATATCTCCACAGAAATCTACCAAGCTGGCTCTACACCCTGCAATGGCGTGAAGGGCTTCAAC
TGCTACTTCCCCCTGCAGTCTTACGGCTTTCAGCCCACCTACGGCGTCCGGCTACCAGCCCTACAGAGTAGTCGTC
CTGAGCTTCGAGCTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGCGGCCCAAGAAATCCACTAACCTGGTGAAGAACAAA
TGA 3'
```

Figura 4.4-Secuencia consenso obtenida a partir del ensamblado de las secuencias nucleotídicas



La secuencia consenso obtenida fue alineada con la secuencia de referencia (dRBD-OP/M).

Los resultados obtenidos se detallan en la **Figura 5.4**

Section 1					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1)	1	10	29	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1)	-----	GTITCTAGTGTACTAACCCT		
Consensus	(1)	-----	GTITCTAGTGTACTAACCCT		
Section 2					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(30)	30	40	58	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(22)		AGTGTCTCTCTCAGAGAGTGCACCAACCG		
Consensus	(30)		AGTGTCTCTCTCAGAGAGTGCACCAACCG		
Section 3					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(59)	59	70	87	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(51)		AGTCCATCGTGGGTTCCTAACATCACC		
Consensus	(59)		AGTCCATCGTGGGTTCCTAACATCACC		
Section 4					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(88)	88	100	116	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(80)		AACCTGTGTCTTTTGGGAGGTGTTCAA		
Consensus	(88)		AACCTGTGTCTTTTGGGAGGTGTTCAA		
Section 5					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(117)	117	130	145	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(109)		CGCCACCAGATTGCGCTCCGTTACGCTT		
Consensus	(117)		CGCCACCAGATTGCGCTCCGTTACGCTT		
Section 6					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(146)	146	160	174	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(138)		GGAAOCGGGAGAGAACTCCCAACTGTGTG		
Consensus	(146)		GGAAOCGGGAGAGAACTCCCAACTGTGTG		
Section 7					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(175)	175	180	190	203
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(167)		GCTGACTACTCCGTTGCTTACAACTGTGC		
Consensus	(175)		GCTGACTACTCCGTTGCTTACAACTGTGC		
Section 8					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(204)	204	210	220	232
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(196)		TTCITTTCTCCACCTTCAAGTGTACGGGG		
Consensus	(204)		TTCITTTCTCCACCTTCAAGTGTACGGGG		
Section 9					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(233)	233	240	250	261
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(225)		TGTCTCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGC		
Consensus	(233)		TGTCTCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGC		
Section 10					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(262)	262	270	280	290
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(254)		TTCACAAACGTGTACGCCGACTCCITCGT		
Consensus	(262)		TTCACAAACGTGTACGCCGACTCCITCGT		
Section 11					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(291)	291	300	319	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(283)		GATCAGAGGGGACGAAAGTGGAGCAGATCG		
Consensus	(291)		GATCAGAGGGGACGAAAGTGGAGCAGATCG		
Section 12					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(320)	320	330	348	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(312)		CCCCTGGACAGACCAGCCATCGCGGAT		
Consensus	(320)		CCCCTGGACAGACCAGCCATCGCGGAT		
Section 13					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(349)	349	360	377	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(341)		TACAACTACAAGCTGCCGTGATGACTTCAC		
Consensus	(349)		TACAACTACAAGCTGCCGTGATGACTTCAC		
Section 14					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(378)	378	390	406	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(370)		GGGTGTGTGATTTGCTGGAAATTCGAAAC		
Consensus	(378)		GGGTGTGTGATTTGCTGGAAATTCGAAAC		
Section 15					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(407)	407	420	435	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(399)		ACCTGGACTCTAAAGTGGGCGGCAACTAC		
Consensus	(407)		ACCTGGACTCTAAAGTGGGCGGCAACTAC		
Section 16					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(436)	436	450	464	
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(428)		AACATCTGTACAGACTGTTCGGAAAGTG		
Consensus	(436)		AACATCTGTACAGACTGTTCGGAAAGTG		
Section 17					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(465)	465	470	480	493
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(457)		CAACTGAAAGCCCTTCGAGCGGGACATCG		
Consensus	(465)		CAACTGAAAGCCCTTCGAGCGGGACATCG		
Section 18					
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(494)	494	500	510	522
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(486)		CTACCGAGATCTATCAGGCGGGATCTACG		
Consensus	(494)		CTACCGAGATCTATCAGGCGGGATCTACG		



		Section 28			
	(784)	784	790	800	812
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(776)	TTGGCTTCTGTGTACGCTTGGAACAGAAA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(784)	TTGGCTTCTGTGTACGCTTGGAACAGAAA			
Consensus	(784)	TTGGCTTCTGTGTACGCTTGGAACAGAAA			
		Section 29			
	(813)	813	820	830	841
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(805)	GCGGATCAGCAAATGGGTGGCCGACTACT			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(813)	GCGGATCAGCAAATGGGTGGCCGACTACT			
Consensus	(813)	GCGGATCAGCAAATGGGTGGCCGACTACT			
		Section 30			
	(842)	842	850	860	870
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(834)	CTGTGCTGTACAAATTCGGCCAGCTTCAGC			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(842)	CTGTGCTGTACAAATTCGGCCAGCTTCAGC			
Consensus	(842)	CTGTGCTGTACAAATTCGGCCAGCTTCAGC			
		Section 31			
	(871)	871	880		899
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(863)	ACCTTCAAGTGCATATGGCGTGAAGCCCAAC			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(871)	ACCTTCAAGTGCATATGGCGTGAAGCCCAAC			
Consensus	(871)	ACCTTCAAGTGCATATGGCGTGAAGCCCAAC			
		Section 32			
	(900)	900	910		928
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(892)	CAAGCTGAAACGATCTCTGTTCACAAATG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(900)	CAAGCTGAAACGATCTCTGTTCACAAATG			
Consensus	(900)	CAAGCTGAAACGATCTCTGTTCACAAATG			
		Section 33			
	(929)	929	940		957
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(921)	TGTACGCCGACTCTCTGTGATCCGGGGC			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(929)	TGTACGCCGACTCTCTGTGATCCGGGGC			
Consensus	(929)	TGTACGCCGACTCTCTGTGATCCGGGGC			
		Section 34			
	(958)	958	970		986
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(950)	GACGAGGTGCGGCAGATCGCTCTCTGGGCA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(958)	GACGAGGTGCGGCAGATCGCTCTCTGGGCA			
Consensus	(958)	GACGAGGTGCGGCAGATCGCTCTCTGGGCA			
		Section 35			
	(987)	987	1000		1015
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(979)	GACCGGCACCATCGCCGACTACAATTACA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(987)	GACCGGCACCATCGCCGACTACAATTACA			
Consensus	(987)	GACCGGCACCATCGCCGACTACAATTACA			
		Section 36			
	(1016)	1016	1030		1044
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1008)	AGCTGGCTGACGACTTCAACCGGCTGTGTG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1016)	AGCTGGCTGACGACTTCAACCGGCTGTGTG			
Consensus	(1016)	AGCTGGCTGACGACTTCAACCGGCTGTGTG			
		Section 37			
	(1045)	1045	1050	1060	1073
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1037)	ATCGCTTGGAACTCCAAACAACTGGATTG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1045)	ATCGCTTGGAACTCCAAACAACTGGATTG			
Consensus	(1045)	ATCGCTTGGAACTCCAAACAACTGGATTG			
		Section 38			
	(1074)	1074	1080	1090	1102
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1066)	CAAGGTGGGCGGAACTACAACCTACCTGT			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1074)	CAAGGTGGGCGGAACTACAACCTACCTGT			
Consensus	(1074)	CAAGGTGGGCGGAACTACAACCTACCTGT			
		Section 39			
	(1103)	1103	1110	1120	1131
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1095)	ACCGGCTGTTCAGAAAATCCAACTGTGAAG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1103)	ACCGGCTGTTCAGAAAATCCAACTGTGAAG			
Consensus	(1103)	ACCGGCTGTTCAGAAAATCCAACTGTGAAG			
		Section 40			
	(1132)	1132	1140	1150	1160
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1124)	CCTTTTGAGAGAGATATCTCCACAGAAAT			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1132)	CCTTTTGAGAGAGATATCTCCACAGAAAT			
Consensus	(1132)	CCTTTTGAGAGAGATATCTCCACAGAAAT			
		Section 41			
	(1161)	1161	1170		1189
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1153)	CTACCAAAGCTGGCTTACACCCGTGCAATG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1161)	CTACCAAAGCTGGCTTACACCCGTGCAATG			
Consensus	(1161)	CTACCAAAGCTGGCTTACACCCGTGCAATG			
		Section 42			
	(1190)	1190	1200		1218
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1182)	GGGTGAAAGGGCTTCAACTGTACTTCCCC			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1190)	GGGTGAAAGGGCTTCAACTGTACTTCCCC			
Consensus	(1190)	GGGTGAAAGGGCTTCAACTGTACTTCCCC			
		Section 43			
	(1219)	1219	1230		1247
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1211)	CTGCAGTCTTACGGCTTTCAGCCCACTTA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1219)	CTGCAGTCTTACGGCTTTCAGCCCACTTA			
Consensus	(1219)	CTGCAGTCTTACGGCTTTCAGCCCACTTA			
		Section 44			
	(1248)	1248	1260		1276
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1240)	GCGGTGCGGCTACCGCCCTACAGAGTAG			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1248)	GCGGTGCGGCTACCGCCCTACAGAGTAG			
Consensus	(1248)	GCGGTGCGGCTACCGCCCTACAGAGTAG			
		Section 45			
	(1277)	1277	1290		1305
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1269)	TGTGCTGAGCTTGGAGCTGTGACAGCC			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1277)	TGTGCTGAGCTTGGAGCTGTGACAGCC			
Consensus	(1277)	TGTGCTGAGCTTGGAGCTGTGACAGCC			
		Section 46			
	(1306)	1306	1320		1334
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1298)	CCCTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1306)	CCCTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			
Consensus	(1306)	CCCTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			
		Section 47			
	(1335)	1335	1340		1359
Consenso - Secuencias Transcrito RCB dRBD-OP/M6L...	(1327)	CACTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			
Secuencia Referencia dRBD-OP-M	(1335)	CACTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			
Consensus	(1335)	CACTAACCTGGTGAAGAACAAATGA			

Figura 5.4- Resultados de alineación de secuencia consenso con secuencia de referencia dRBD-OP/M



El resultado obtenido del alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región codificante para el antígeno RBDscd Gamma maduro (sin péptido señal) arroja una homología del 100% con respecto al vector de origen (Referencia dRBD-OP-M).

### 4.1.2 SECUENCIACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO CORRESPONDIENTE AL ARN MENSAJERO CODIFICANTE PARA RBDSCD ÓMICRON BA.4/5.

La identidad del clon dRBD-OBA4.5/319 -658, a nivel de secuencia nucleotídica del ARNm fue verificada por transcripción reversa (RT-PCR) y secuenciación nucleotídica del ADN complementario (cDNA).

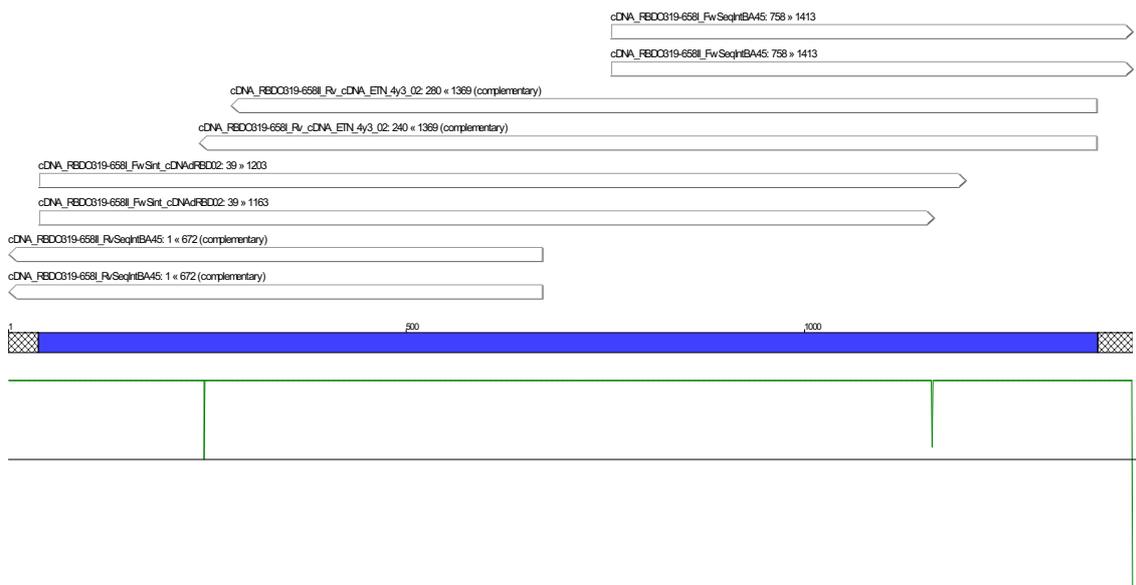


Figura 6.4 -Esquema del ensamblado de las secuencias nucleotídicas obtenidas con los primers diseñados para abarcar el total del fragmento de cDNA

```

CTAGTGCTACTACCACTAGTCTCCAGCCAGAGAGTGCAGCCACAGAATCCATCGTCAGATTCCCTAACATCACC
AACCTGTGCCCTTTTCGACGAAGTGTTCACCGCTACCCGGTTCGCTCTGTGTACGCTTGGAAACCGCAAAAGAATC
AGCAACTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACCTTCGCCCCATCTCTCGCCTTCAAGTGCTACGGAGTGTCC
CCTACCAAGCTCAACGATCTGTGCTTCACCAACGTGTATGCCGATTCTTTTGTGATCCGGGGCAACGAAGTGTCT
CAGATCGCTCCTGGCCAGACCCGCAACATCGCCGACTACAACCTACAAGCTGCCCGACGACTTTACCGGCTGCGTG
ATCGCCTGGAATTCTAACAAAGCTGGACTCCAAGGTGGGCGGGAACATAAATAATAGATACCGGCTGTTCGGGAAG
TCCAACCTGAAGCCCTTCGAGAGAGATATTTCCACAGAGATCTACCAGGCTGGCAACCAAGCCCTGTAACGGCGTG
GCCGGCGTGAAGTGTACTTCCCTCTGCAGTCTACGGCTTCAGACCTACTTACGGCGTGGGACACCAGCCTTAC
AGGGTGGTGGTGTCTTCGAGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAATCTACCAACCTG
GTGAAGAACAAGAGAGTGAACCCACCGAGTCTATCGTGCAGGTTCCCTAACATCACCATCTGTGTCTTTTGAC
GAGGTATTCAACGCCACCAAGATTCGCTCCGTGTACGCTTGGAAACCGGAAGCGGATCTCCAACCTGCGTGTGAC
TACTCCGTGTGTACAACCTTTGCTCCTTTCTTCGCCTTCAAGTGTACGGCGTGTCTCTTACCAAACCTGAACGAC
CTGTGCTTACCAACGCTGTACCGGACTCTTTTCGTGATCAGAGGCAACGAGGTGTCCAGATCGCTCCTGGCCAG
ACCGGCAATATCGCCGATTACAATTACAAGTTGCCTGACGACTTCACCGGCTGTGTAATCGCTTGGAACTCCAAT
AAGCTGGATTCTAAAGTGGGCGGAAATTACAACCTACAGATACAGACTGTTCGGGAAGAGCAACCTGAAGCCTTTC
GAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCCGGCAACAAGCCATGCAACGGCGTGGCTGGAGTGAACCTGCTAC
TTTCTCTGCAGTCTTACGGCTTTAGACCTACCTACGGTGTGGCCACCAACCATAACAGAGTGGTGGTCTGTGAGC
TTGAACTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGTGGCCCCAAGAAGTCTACAAACCTGGTGAAGAACAAATGAACC
GGTGGTTACCGTTTAAACGATCGTTCGGAGTTCGACGGTACCGCGGGCCCAACTTGTATTATTC
    
```

Figura 7.4-Secuencia nucleotídica consenso.



La secuencia consenso obtenida fue alineada con la secuencia de referencia (dRBD-OP/M) utilizando el programa mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos se detallan en la **Figura 8.4:**

```
6751          6800
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1) -----
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (6751) GACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAAGTTCGAGTCGACGGTACCGG
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1) -----
Consensus (6751)
6801          6850
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1) ----- ATGTTTGTGTTTCTAGTGCTACTACCACTAGT
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (6801) GGCCCGGGATCCGCCACCATGTTTGTGTTTCTAGTGCTACTACCACTAGT
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1) ----- CTAGTGCTACTACCACTAGT
Consensus (6801) ATGTTTGTGTTTCTAGTGCTACTACCACTAGT
6851          6900
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (33) CTCCAGCCAGAGAGTGCAGCCACAGAATCCATCGTCAGATTCCCTAACA
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (6851) CTCCAGCCAGAGAGTGCAGCCACAGAATCCATCGTCAGATTCCCTAACA
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (21) CTCCAGCCAGAGAGTGCAGCCACAGAATCCATCGTCAGATTCCCTAACA
Consensus (6851) CTCCAGCCAGAGAGTGCAGCCACAGAATCCATCGTCAGATTCCCTAACA
6901          6950
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (83) TCACCAACTGTGCCCTTTCGACGAAGTGTTCACGCTACCCGGTTCGCC
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (6901) TCACCAACTGTGCCCTTTCGACGAAGTGTTCACGCTACCCGGTTCGCC
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (71) TCACCAACTGTGCCCTTTCGACGAAGTGTTCACGCTACCCGGTTCGCC
Consensus (6901) TCACCAACTGTGCCCTTTCGACGAAGTGTTCACGCTACCCGGTTCGCC
6951          7000
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (133) TCTGTGTACGCTTGGAAACCGCAAAGAATCAGCAACTGCGTGGCCGACTA
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (6951) TCTGTGTACGCTTGGAAACCGCAAAGAATCAGCAACTGCGTGGCCGACTA
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (121) TCTGTGTACGCTTGGAAACCGCAAAGAATCAGCAACTGCGTGGCCGACTA
Consensus (6951) TCTGTGTACGCTTGGAAACCGCAAAGAATCAGCAACTGCGTGGCCGACTA
7001          7050
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (183) CTCCTGTCTGTACAACCTTCGCCCATCTTCGCTTCAAGTGTACGGAG
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7001) CTCCTGTCTGTACAACCTTCGCCCATCTTCGCTTCAAGTGTACGGAG
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (171) CTCCTGTCTGTACAACCTTCGCCCATCTTCGCTTCAAGTGTACGGAG
Consensus (7001) CTCCTGTCTGTACAACCTTCGCCCATCTTCGCTTCAAGTGTACGGAG
7051          7100
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (233) TGTCCTTACCAAGCTCAACGATCTGTGCTTCAACCAAGTGTATGCCGAT
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7051) TGTCCTTACCAAGCTCAACGATCTGTGCTTCAACCAAGTGTATGCCGAT
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (221) TGTCCTTACCAAGCTCAACGATCTGTGCTTCAACCAAGTGTATGCCGAT
Consensus (7051) TGTCCTTACCAAGCTCAACGATCTGTGCTTCAACCAAGTGTATGCCGAT
7101          7150
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (283) TCTTTTGTGATCCGGGGCAACGAAGTGTCTCAGATCGCTCCTGGCCAGAC
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7101) TCTTTTGTGATCCGGGGCAACGAAGTGTCTCAGATCGCTCCTGGCCAGAC
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (271) TCTTTTGTGATCCGGGGCAACGAAGTGTCTCAGATCGCTCCTGGCCAGAC
Consensus (7101) TCTTTTGTGATCCGGGGCAACGAAGTGTCTCAGATCGCTCCTGGCCAGAC
7151          7200
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (333) CGGCAACATCGCCGACTACAACCTACAAGCTGCCGACGACTTACCGGCT
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7151) CGGCAACATCGCCGACTACAACCTACAAGCTGCCGACGACTTACCGGCT
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (321) CGGCAACATCGCCGACTACAACCTACAAGCTGCCGACGACTTACCGGCT
Consensus (7151) CGGCAACATCGCCGACTACAACCTACAAGCTGCCGACGACTTACCGGCT
7201          7250
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (383) GCGTGATCGCCTGGAATCTAACAAGCTGGACTCCAAGTGGCGGGGAAC
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7201) GCGTGATCGCCTGGAATCTAACAAGCTGGACTCCAAGTGGCGGGGAAC
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (371) GCGTGATCGCCTGGAATCTAACAAGCTGGACTCCAAGTGGCGGGGAAC
Consensus (7201) GCGTGATCGCCTGGAATCTAACAAGCTGGACTCCAAGTGGCGGGGAAC
7251          7300
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (433) TATAACTATAGATACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAACCTGAAGCCCTTCGA
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7251) TATAACTATAGATACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAACCTGAAGCCCTTCGA
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (421) TATAACTATAGATACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAACCTGAAGCCCTTCGA
Consensus (7251) TATAACTATAGATACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAACCTGAAGCCCTTCGA
7301          7350
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (483) GAGAGATATTTCCACAGAGATCTACCAGGCTGGCAACAAGCCCTGTAACG
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7301) GAGAGATATTTCCACAGAGATCTACCAGGCTGGCAACAAGCCCTGTAACG
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (471) GAGAGATATTTCCACAGAGATCTACCAGGCTGGCAACAAGCCCTGTAACG
Consensus (7301) GAGAGATATTTCCACAGAGATCTACCAGGCTGGCAACAAGCCCTGTAACG
7351          7400
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (533) GCGTGGCCGGCGTGAAGTGTACTTCCCTCTGAGTCTACGGCTTCAGA
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7351) GCGTGGCCGGCGTGAAGTGTACTTCCCTCTGAGTCTACGGCTTCAGA
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (521) GCGTGGCCGGCGTGAAGTGTACTTCCCTCTGAGTCTACGGCTTCAGA
Consensus (7351) GCGTGGCCGGCGTGAAGTGTACTTCCCTCTGAGTCTACGGCTTCAGA
7401          7450
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (583) CTAAGTACCGCGTGGGACACAGCCTTACAGGGTGGTGGTGTCTCTT
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7401) CTAAGTACCGCGTGGGACACAGCCTTACAGGGTGGTGGTGTCTCTT
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (571) CTAAGTACCGCGTGGGACACAGCCTTACAGGGTGGTGGTGTCTCTT
Consensus (7401) CTAAGTACCGCGTGGGACACAGCCTTACAGGGTGGTGGTGTCTCTT
7451          7500
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (633) CGAGCTGCTGCATGCTCTGCCACAGTGTGGCCCTAAGAAATCTACCA
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7451) CGAGCTGCTGCATGCTCTGCCACAGTGTGGCCCTAAGAAATCTACCA
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (621) CGAGCTGCTGCATGCTCTGCCACAGTGTGGCCCTAAGAAATCTACCA
Consensus (7451) CGAGCTGCTGCATGCTCTGCCACAGTGTGGCCCTAAGAAATCTACCA
7501          7550
Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (683) ACCTGGTGAAGAACAAGAGAGTGCACCCACCGAGTCTATCGTGGGTTT
pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7501) ACCTGGTGAAGAACAAGAGAGTGCACCCACCGAGTCTATCGTGGGTTT
Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (671) ACCTGGTGAAGAACAAGAGAGTGCACCCACCGAGTCTATCGTGGGTTT
```



Consensus (7501) ACCTGGTGAAGAACAAAGAGAGTGCAACCCACCGAGTCTATCGTGCGGTTG  
 7551 7600  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (733) **CCTAACATCACC**AACTGTGCTCTTTGACGAGGATTCAACGCCACCAAG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7551) **CCTAACATCACC**AACTGTGCTCTTTGACGAGGATTCAACGCCACCAAG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (721) **CCTAACATCACC**AACTGTGCTCTTTGACGAGGATTCAACGCCACCAAG  
 Consensus (751) CCTAACATCACC~~AACTGTGCTCTTTGACGAGGATTCAACGCCACCAAG~~  
 7601 7650  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (783) **ATTGCGCTCCG**TGACGCTGGAACCGGAAGCGGATCTCCAACCTGCGTGC  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7601) **ATTGCGCTCCG**TGACGCTGGAACCGGAAGCGGATCTCCAACCTGCGTGC  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (771) **ATTGCGCTCCG**TGACGCTGGAACCGGAAGCGGATCTCCAACCTGCGTGC  
 Consensus (7601) ATTGCGCTCCG~~TGACGCTGGAACCGGAAGCGGATCTCCAACCTGCGTGC~~  
 7651 7700  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (833) **CTGACTACTCCG**TGCTGACAACCTTGTCTCTTCTTCGCTTCAAGTGG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7651) **CTGACTACTCCG**TGCTGACAACCTTGTCTCTTCTTCGCTTCAAGTGG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (821) **CTGACTACTCCG**TGCTGACAACCTTGTCTCTTCTTCGCTTCAAGTGG  
 Consensus (7651) CTGACTACTCCG~~TGCTGACAACCTTGTCTCTTCTTCGCTTCAAGTGG~~  
 7701 7750  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (883) **TACGGCGTGT**CTCTACCAAACTGAACGACCTGTGCTTCAACACGTGTA  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7701) **TACGGCGTGT**CTCTACCAAACTGAACGACCTGTGCTTCAACACGTGTA  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (871) **TACGGCGTGT**CTCTACCAAACTGAACGACCTGTGCTTCAACACGTGTA  
 Consensus (7701) TACGGCGTGT~~CTCTACCAAACTGAACGACCTGTGCTTCAACACGTGTA~~  
 7751 7800  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (933) **CGCCGACTCTT**CGTGATCAGAGGCAACGAGGTGCCAGATCGCTCCTG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7751) **CGCCGACTCTT**CGTGATCAGAGGCAACGAGGTGCCAGATCGCTCCTG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (921) **CGCCGACTCTT**CGTGATCAGAGGCAACGAGGTGCCAGATCGCTCCTG  
 Consensus (7751) CGCCGACTCTT~~CGTGATCAGAGGCAACGAGGTGCCAGATCGCTCCTG~~  
 7801 7850  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (983) **GCCAGACCGG**CAATATCGCCGATTACAATTACAAGTTGCCTGACGACTTC  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7801) **GCCAGACCGG**CAATATCGCCGATTACAATTACAAGTTGCCTGACGACTTC  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (971) **GCCAGACCGG**CAATATCGCCGATTACAATTACAAGTTGCCTGACGACTTC  
 Consensus (7801) GCCAGACCGG~~CAATATCGCCGATTACAATTACAAGTTGCCTGACGACTTC~~  
 7851 7900  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1033) **ACCGGCTGTG**TAAATCGCTTGGAACTCCAATAAGCTGGATTCTAAAGTGGG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7851) **ACCGGCTGTG**TAAATCGCTTGGAACTCCAATAAGCTGGATTCTAAAGTGGG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1021) **ACCGGCTGTG**TAAATCGCTTGGAACTCCAATAAGCTGGATTCTAAAGTGGG  
 Consensus (7851) ACCGGCTGTG~~TAAATCGCTTGGAACTCCAATAAGCTGGATTCTAAAGTGGG~~  
 7901 7950  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1083) **CGGAAATTACA**ACTACAGATACAGACTGTCCGGAAAGCAACCTGAAGC  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7901) **CGGAAATTACA**ACTACAGATACAGACTGTCCGGAAAGCAACCTGAAGC  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1071) **CGGAAATTACA**ACTACAGATACAGACTGTCCGGAAAGCAACCTGAAGC  
 Consensus (7901) CGGAAATTACA~~ACTACAGATACAGACTGTCCGGAAAGCAACCTGAAGC~~  
 7951 8000  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1133) **CTTTCGAGCG**GGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCCGGCAACAAGCCA  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (7951) **CTTTCGAGCG**GGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCCGGCAACAAGCCA  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1121) **CTTTCGAGCG**GGACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCCGGCAACAAGCCA  
 Consensus (7951) CTTTCGAGCGG~~ACATCTCCACCGAGATCTACCAGGCCGGCAACAAGCCA~~  
 8001 8050  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1183) **TGCAACGGCG**TGGTGGAGTGAAGTCTACTTCTCTGCACTTACGG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8001) **TGCAACGGCG**TGGTGGAGTGAAGTCTACTTCTCTGCACTTACGG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1171) **TGCAACGGCG**TGGTGGAGTGAAGTCTACTTCTCTGCACTTACGG  
 Consensus (8001) TGCAACGGCG~~TGGTGGAGTGAAGTCTACTTCTCTGCACTTACGG~~  
 8051 8100  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1233) **CTTTAGACCT**ACTACCGTGTGGCCACCAACCATACAGAGTGGTGGTCC  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8051) **CTTTAGACCT**ACTACCGTGTGGCCACCAACCATACAGAGTGGTGGTCC  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1221) **CTTTAGACCT**ACTACCGTGTGGCCACCAACCATACAGAGTGGTGGTCC  
 Consensus (8051) CTTTAGACCT~~ACTACCGTGTGGCCACCAACCATACAGAGTGGTGGTCC~~  
 8101 8150  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1283) **TGAGCTTGA**ACTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGGCCCCAAGAAG  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8101) **TGAGCTTGA**ACTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGGCCCCAAGAAG  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1271) **TGAGCTTGA**ACTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGGCCCCAAGAAG  
 Consensus (8101) TGAGCTTGA~~ACTGCTGCACGCCCTGCTACCGTGTGGCCCCAAGAAG~~  
 8151 8200  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1333) **TCTACAAAC**CTGGTGAAGAACAATAA-----  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8151) **TCTACAAAC**CTGGTGAAGAACAATAA**TGAACCGGTGGTTACCGTTAAACGA**  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1321) **TCTACAAAC**CTGGTGAAGAACAATAA**TGAACCGGTGGTTACCGTTAAACGA**  
 Consensus (8151) TCTACAAAC~~CTGGTGAAGAACAATAA~~**TGAACCGGTGGTTACCGTTAAACGA**  
 8201 8250  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1357) -----  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8201) **TCGTGCGAG**TCGACGGTACCAGCGGCCCAACTGTTTATTGAGCTTAT  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1371) **TCGTGCGAG**TCGACGGTACCAGCGGCCCAACTGTTTATTGAGCTTATG-----  
 Consensus (8201) TCGTGCAG~~TCGACGGTACCAGCGGCCCAACTGTTTATTGAGCTTATG~~  
 8251 8300  
 Cassette RBDscd Omicron BA.4/5 (1357) -----  
 pIC3UMCS-4 + RBDscd Omicron BA.4/5 (8251) AATGGTTACAATAAAGCAATGACATCACAATTTACAATAAAGCATT  
 Consenso secuenciación cDNA Clon dRBD-O BA4.5-658 (1414) -----  
 Consensus (8251)

**Figura 8.4: Alineamiento de la Secuencia Nucleotídica Consenso (SNC) del análisis de Transcrito del RCB dRBD-O 4.5/319 RCB01 Lote:221103 con la secuencia de Referencia.**

El resultado obtenido del alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región codificante para el antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 arroja una homología del 100% con respecto al vector de origen.



### 4.1.3 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR RELATIVO POR SDS PAGE

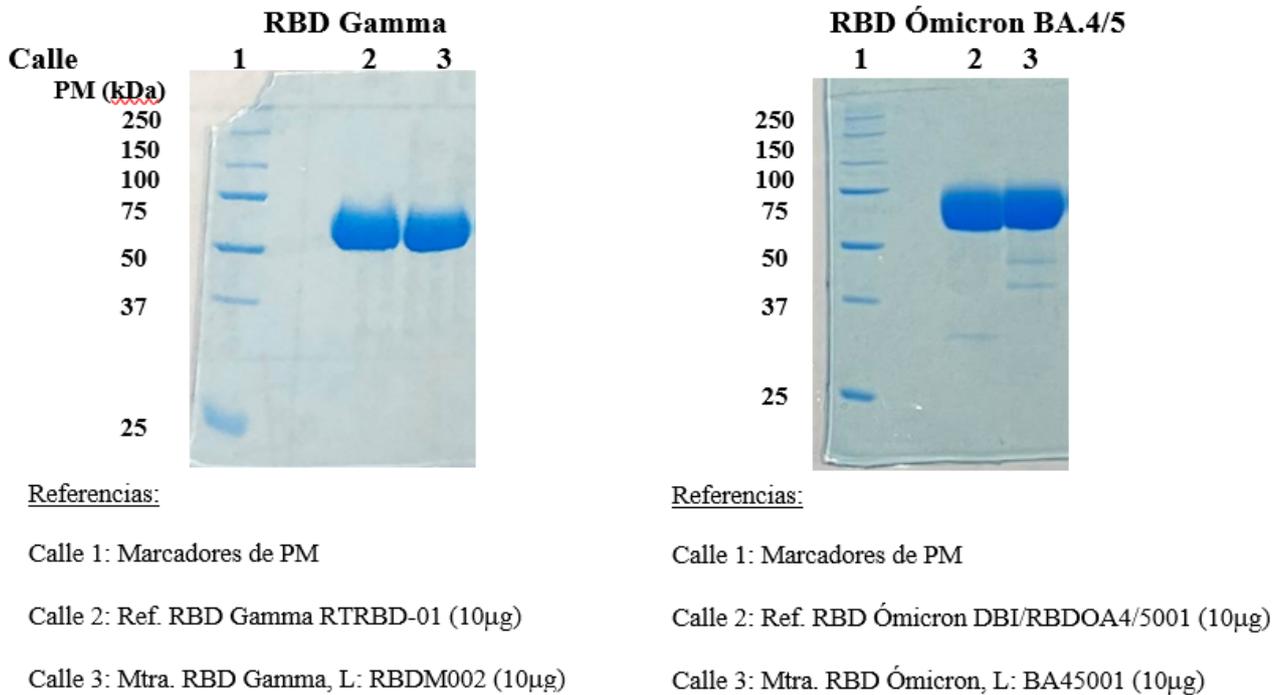


Figura 9.4- Determinación del PM relativo por SDS PAGE reductor para los antígenos RBD Gamma y Ómicron BA.4/5

El SDS PAGE reductor muestra una banda que migra entre los marcadores de PM de 50 y 75 kDa para ambos antígenos.

El PM aparente calculado a partir de la relación lineal entre el log PM y la distancia migrada es de aproximadamente 60 kDa para el RBD Gamma y 68 kDa para RBD Ómicron BA.4/5.

### 4.1.4 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y MODIFICACIONES POST-TRANSLACIONALES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La determinación de la secuencia se llevó a cabo por digestión proteolítica seguida de Cromatografía Líquida (LC) acoplada a Espectrometría de Masas con Ionización tipo Electrospray (ESI-MS) y espectrometría de masa en tándem (MS-MS).

#### 4.1.4.1 RESULTADOS

##### 4.1.4.2.1 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

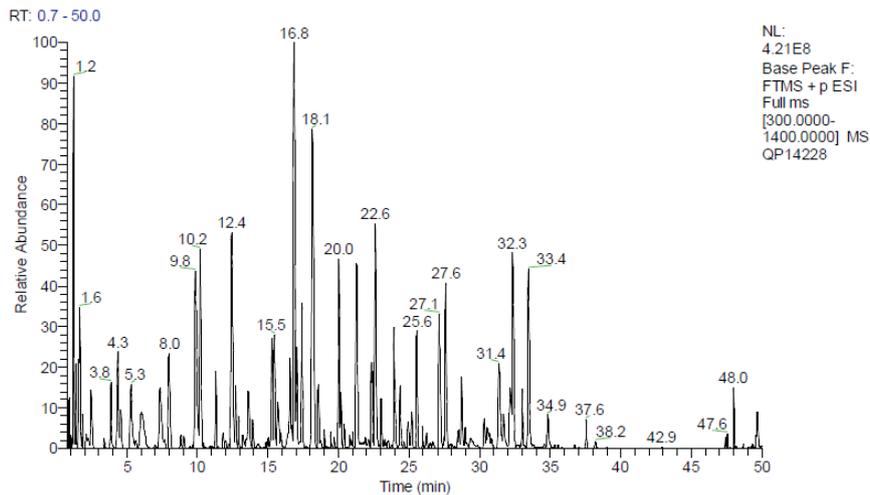
Debido a la homología de las 2 repeticiones (dímero tándem), la secuencia de la primera parte (aa 1-219) es idéntica a la segunda (aa 220-438). Como consecuencia de ello, la mayoría de los péptidos no puede asignarse a una sola de las partes. La única excepción son los péptidos que se extienden entre ambas partes. Esto es así tanto para el software utilizado para determinar la cobertura de la secuencia como para el utilizado para el



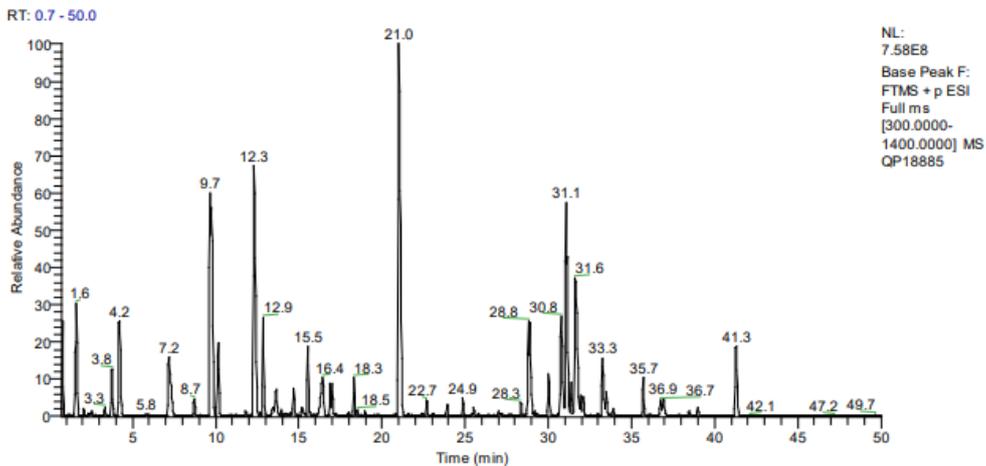
análisis de las modificaciones post translacionales (PTMs). Consecuentemente todos los péptidos que correlacionan con ambas partes fueron asignados a ambas para compensar la homología inherente.

Para ambos antígenos, se determinó un % de cobertura de la secuencia del 100%, teniendo en cuenta la homología de la secuencia.

En la **Figura 10.4** se muestra un ejemplo de cromatograma /MS de una de las digestiones para el antígeno RBDscd Gamma y en la **Figura 11.4** para el antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5.



**Figura 10.4-** Cromatograma LC-ESI-MS y MS-MS de la digestión Tripsina/Quimotripsina de la muestra de antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001. Los espectros de masa (MS) y masa - masa (MS.MS) fueron adquiridos a lo largo de la corrida. La alta resolución y exactitud de la masa permitieron la inequívoca identificación de los péptidos. Todos los picos principales en el espectro MS/MS fueron asignados.



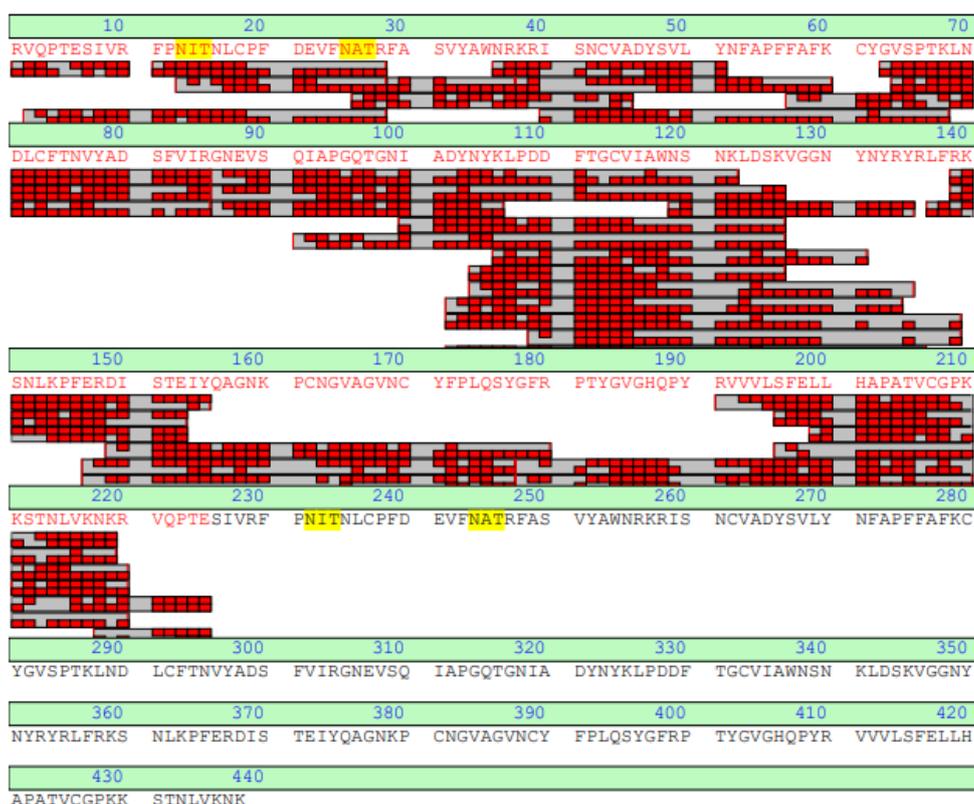
**Figura 11.4:** Cromatograma LC-ESI-MS y MS-MS de la digestión con Tripsina de la muestra de antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001. Los espectros de masa (MS) y masa - masa (MS.MS) fueron adquiridos a lo largo de la corrida. La alta resolución y exactitud de la masa permitieron la inequívoca identificación de los péptidos. Todos los picos principales en el espectro MS/MS fueron asignados.



En las Figuras 12.4 y 13.4 se muestran los resultados de cobertura del 100% de la secuencia para ambos antígenos.



Figura 12.4-Resultados combinados del experimento de mapeo peptídico del antígeno RBDscd Gamma. L: DBI/RBDM001. Se muestran las mediciones LC-ESI-MS y MS-MS de todas las digestiones. En total se observa un 100% de cobertura de la secuencia. Los péptidos identificados por su masa se representan con barras grises, los respectivos fragmentos iónicos identificados por búsqueda en la base de datos se muestran como casilleros rojos dentro de las barras grises.



**Figura 13.4:** Resultados combinados del experimento de mapeo peptídico del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001. Se muestran las mediciones LC-ESI-MS y MS-MS de todas las digestiones. En total se observa un 100% de cobertura de la secuencia. Los péptidos identificados por su masa se representan con barras grises, los respectivos fragmentos iónicos identificados por búsqueda en la base de datos se muestran como casilleros rojos dentro de las barras grises.

#### 4.1.4.2.2 DESAMIDACIONES

Se analizaron los fragmentos conteniendo Asn y Gln en muestras de RBDscd Gamma y RBDscd Ómicron BA.4/5 por cromatografía de extracción iónica, encontrándose como principales péptidos desamidados:

Péptido cubriendo los sitios	Antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001
	% (*)
Q156 N163/Q375 N382	8,2
N163/N382	4,6

**Tabla 4.4:** % de desamidación en L: DBI/RBDM001 basados en la relación de áreas

Péptido cubriendo los sitios	Antígeno RBDscd Ómicron BA4.5, L: BA45001
	% (*)
Q156 N163/Q375 N382	6,4
N163/N382	5,3

**Tabla 5.4:** % de desamidación en L: basados en la relación de áreas (\*): los % por MS fueron calculados sin corregir por la eficacia de la ionización de los distintos péptidos y por lo tanto pueden no reflejar los valores reales.



#### 4.1.4.2.3. VARIANTES N-TERMINALES

Para el antígeno Gamma, los péptidos mayoritarios encontrados fueron variantes O-glicosiladas de un péptido con una <sup>pyro</sup>Q adicional (79,4%), y el péptido esperado (19,4%).

Péptido cubriendo los sitios	Antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001 % (*)
<sup>pyro</sup> QRVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2)	16,9
<sup>pyro</sup> QRVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1)	51,3
<sup>pyro</sup> QRVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)	1,3
Suma de variantes <sup>pyro</sup> Q	<b>79,4%</b>
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2)	2,9
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1)	16,1
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)	0,4
Suma de variantes no modificadas	<b>19,4%</b>
truncado 1-4TESIVR.F	1,2

(\*): los % por MS fueron calculados sin corregir por la eficacia de la ionización de los distintos péptidos y por lo tanto pueden no reflejar los valores reales.

**Tabla 6.4: Variantes N-terminales RBDscd Gamma**

Para el antígeno Ómicron BA4.5, los péptidos mayoritarios encontrados fueron las mismas 3 variantes O-glicosiladas, correspondiendo la forma principal al 85%.

Péptido cubriendo los sitios	Antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001 % (*)
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(2)	0,8
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1)	85,0
RVQPTESIVR.F; Hex(1)HexNAc(1)	11,3
truncado 1-4TESIVR.F	2,8

(\*): los % por MS fueron calculados sin corregir por la eficacia de la ionización de los distintos péptidos y por lo tanto pueden no reflejar los valores reales.

**Tabla 7.4: Variantes N-terminales RBDscd Ómicron BA4.5**



#### 4.1.4.2.3. VARIANTES C-TERMINALES

Para ambos antígenos, el extremo C-terminal se encontró principalmente sin Lys terminal. En la tabla 8 se muestran las principales variantes C-terminales encontradas para ambos antígenos. Se encontraron otras variantes minoritarias truncadas con intensidades menores al 1%.

Péptido cubriendo los sitios	Antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001	Antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001
	% (*)	
E.LLHAPATVCGPKKSTNLVK truncado 437-438	1,2	3,8
E.LLHAPATVCGPKKSTNLVKN truncado K438	88,2	85,3
E.LLHAPATVCGPKKSTNLVKNK	10,2	9,7

(\*) : los % por MS fueron calculados sin corregir por la eficacia de la ionización de los distintos péptidos y por lo tanto pueden no reflejar los valores reales. **Tabla 8.4: Variantes C-terminales**

#### 4.1.4.1 CONCLUSIONES

El antígeno RBDscd Gamma y el antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 pudieron ser exitosamente caracterizados. Teniendo en cuenta la homología de la primera (aa 1-219) y la segunda parte (aa 220-438), pudo confirmarse el 100% de la secuencia para ambos antígenos.

Para la mayor parte de los sitios de desamidación, los % encontrados fueron muy bajos. El mayor grado de desamidación fue localizado en los péptidos cubriendo las posiciones Q156 N163/Q375 N382, 8,2% para RBDscd Gamma y 6,4% para RBDscd Ómicron BA.4/5.

Para el extremo C-terminal, la forma con una Lys truncada se encontró como la especie mayoritaria (85% en ambos antígenos).

La mayor parte de los péptidos N-terminales se encuentran O-glicosilados (T5), siendo la forma con una <sup>pyro</sup>Q la especie predominante para RBDscd Gamma.

#### 4.5 DETERMINACIÓN DEL PM SOBRE LA PROTEÍNA N-DEGLICOSILADA POR LC-ESI-MS.

Este análisis fue realizado por Protagen Protein Services.

La determinación del peso molecular intacto se llevó a cabo sobre la proteína en su estado N-deglicosilado por Cromatografía Líquida de Fase Reversa de Ultra Performance (RP-UPLC) acoplada a Espectrometría de Masas de Ionización tipo Electrospray con cuadrupolo de tiempo de vuelo (ESI-QTOF-MS).

#### 4.1.5.2 RESULTADOS

##### RBDscd Gamma:

Pudo determinarse exitosamente la masa de la muestra del antígeno RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001 en su estado N-deglicosilado. La determinación de la masa molecular intacta es consistente con la calculada teórica a partir de la secuencia, teniendo en cuenta las modificaciones post-traslacionales observadas.



Se observaron 3 grupos de señales, correspondientes a la forma completamente N-deglicosilada, así como también las simple y doble glicosiladas respectivamente. Esto indica que la reacción de N-deglicosilación fue incompleta, dejando en la molécula N-glicanos incluyendo las formas FA2G2 y FA2G2S1.

Para cada uno de los 3 grupos, se observó una heterogeneidad adicional proveniente de la presencia de O-glicanos. El patrón de O-glicanos del grupo completamente deglicosilado muestra que las especies O-glicosiladas mayoritarias corresponden a Hex2HexNAc2NeuAc2 y Hex2HexNAc2NeuAc3, detectándose con intensidades menores Hex2HexNAc2NeuAc1 y Hex2HexNAc2NeuAc4.

Adicionalmente, se encontraron las siguientes modificaciones a la secuencia proteica como formas mayoritarias: Lisina C-terminal truncada y una Glutamina N-terminal adicional convertida en piroglutamato.

Forma completamente N-deglicosilada			
Asignado a	Masa prom. experimental (Da)	Masa promedio teórica (Da)	Intensidad relativa (%)
<b>RBDscd Gamma</b> + 4 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2Hex2HexNAc1NeuAc (O-glicano)	50286,8	50285,9	9,3
<b>RBDscd Gamma</b> + 4 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2Hex2HexNAc2NeuAc (O-glicano)	50579,3	50577,1	51,1
<b>RBDscd Gamma</b> + 4 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2 Hex2HexNAc3NeuAc (O-glicano)	50870,4	50868,4	30,6
<b>RBDscd Gamma</b> + 4 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2Hex2HexNAc4NeuAc (O-glicano)	51163,4	51159,6	9,0

Tabla 9.4: Resumen de resultados del antígeno RBDscd Gamma, L:DBI/RBDM001 en su estado completamente N-deglicosilado.

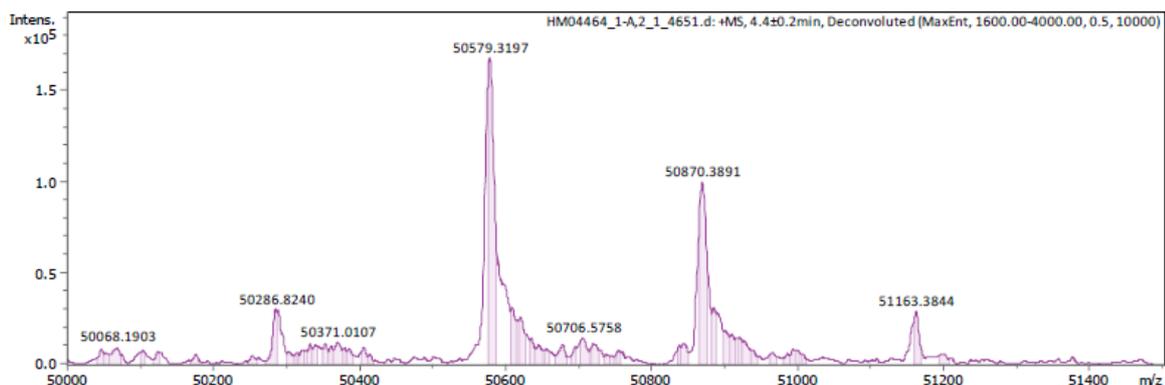




Figura 14.4: Zoom de la región correspondiente a la forma completamente N-deglicosilada del espectro de masa deconvolucionado del antígeno RBDscd Gamma L:DBI/RBDM001

Forma simple N-glicosilada (solo menor masa detectable)			
Asignado a	Masa prom. experimental (Da)	Masa promedio teórica (Da)	Diferencia de masa (Da)
<b>RBDscd Gamma</b> + 3 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2Hex2HexNAc2NeuAc (O-glicano) + FA2G2 (N-glicano)	52346,8 <sup>(#)</sup>	52345,7	1,1
Forma doblemente N-glicosilada (solo menor masa detectable)			
<b>RBDscd Gamma</b> + 3 desamidaciones + N-terminal pyroE adicional + K truncado C-terminal + 2Hex2HexNAc2NeuAc (O-glicano) + FA2G2S1 (N-glicano)	54406,6 <sup>(#)</sup>	54405,6	1,0

<sup>(#)</sup> Artefactos provenientes de la N-deglicosilación incompleta, solo pudieron asignarse las menores masas detectables.

**Tabla 10.4: Resumen de resultados del antígeno RBDscd Gamma, L:DBI/RBDM001 en su estado simple y doblemente N-deglicosilado.**

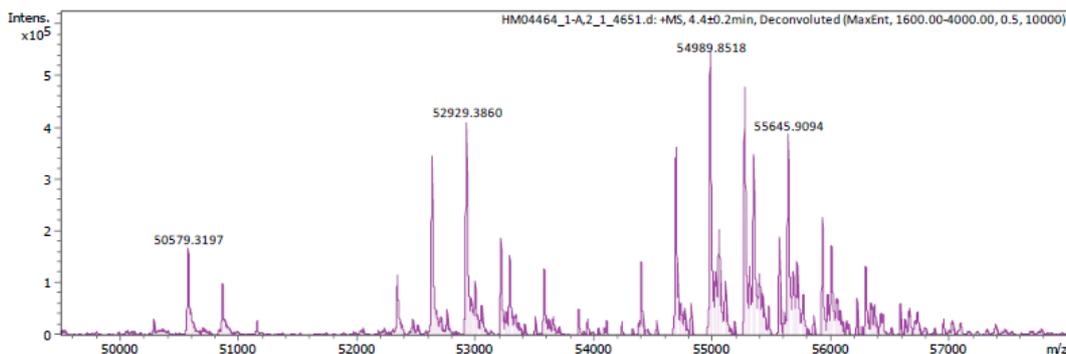


Figura 15.4: Espectro de masa deconvolucionado del antígeno RBDscd Gamma L:DBI/RBDM001 N-deglicosilado

### RBDscd Ómicron BA.4/5:

Pudo determinarse exitosamente la masa de la muestra del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001 en su estado N-deglicosilado. La determinación de la masa molecular intacta es consistente con la calculada teórica a partir de la secuencia, teniendo en cuenta las modificaciones post-traslacionales observadas.

Se observaron 3 grupos de señales, correspondientes a la forma completamente N-deglicosilada, así como también las simple y doble glicosiladas respectivamente. Esto indica que la reacción de N-deglicosilación fue incompleta, dejando en la molécula N-glicanos incluyendo.

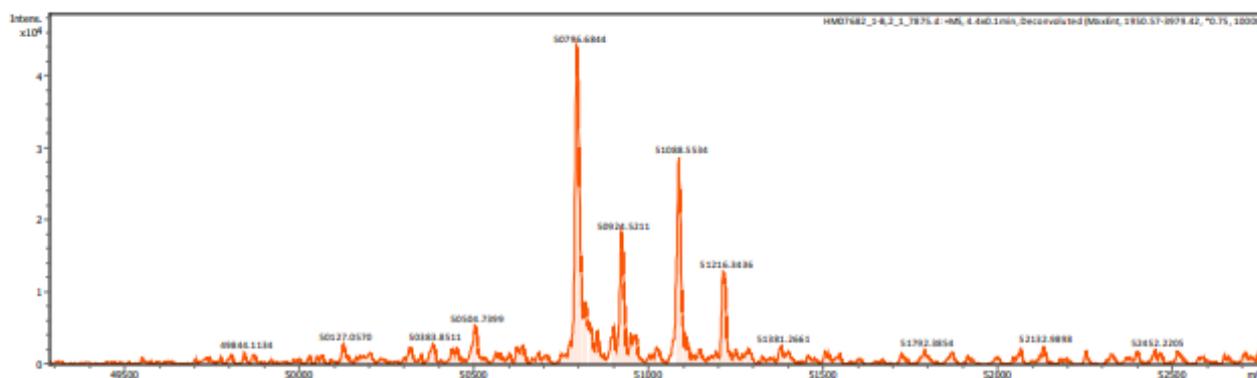
El patrón de O-glicanos del grupo completamente deglicosilado muestra que las especies O-glicosiladas mayoritarias corresponden a Hex2HexNAc4NeuAc1 y Hex2HexNAc4NeuAc2, detectándose con intensidades menores Hex2HexNAc4NeuAc1, Hex2HexNAc4NeuAc2 y Hex2HexNAc4.



Adicionalmente, se encontraron las siguientes modificaciones a la secuencia proteica como forma mayoritaria: Lisina C-terminal truncada.

Forma completamente N-deglicosilada			
Asignado a	Masa prom. experimental (Da)	Masa prom. teórica (Da)	Intensidad relativa (%)
<b>RBDscd Ómicron BA.4/5</b> + 4 desamidaciones + K truncado C-terminal + 2Hex4HexNAc (O-glicano)	50504,7	50508,4	4,9
<b>RBDscd Ómicron BA.4/5</b> + 4 desamidaciones + K truncado C-terminal + 2Hex4HexNAc1NeuAc (O-glicano)	50796,7	50799,6	40,4
<b>RBDscd Ómicron BA.4/5</b> + 4 desamidaciones +2 Hex4HexNAc1NeuAc (O-glicano)	50924,5	50927,8	16,8
<b>RBDscd Ómicron BA.4/5</b> + 4 desamidaciones + K truncado C-terminal +2 Hex4HexNAc2NeuAc (O-glicano)	51088,6	51090,9	26,3
<b>RBDscd Ómicron BA.4/5</b> + 4 desamidaciones + 2Hex4HexNAc2NeuAc (O-glicano)	51216,3	51219,1	11,7

**Tabla 11.4: Resumen de resultados del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5, L: BA45001 en su estado completamente N-deglicosilado.**



**Figura 16.4: Zoom de la región correspondiente a la forma completamente N-deglicosilada del espectro de masa deconvolucionado del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L:BA45001**

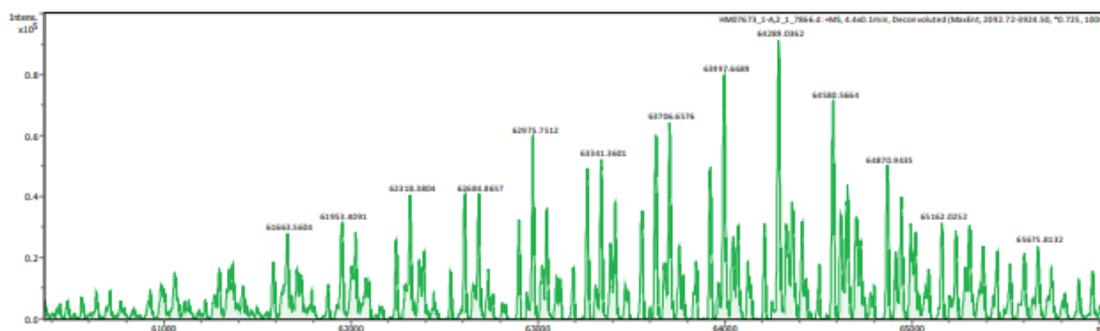


### Determinación del peso molecular intacto

El estado intacto mostró un complejo perfil con varias modificaciones. La masa más abundante identificada fue de 64289,0 Da con una intensidad relativa del 14,5%. Su diferencia de masa respecto de la forma completamente N-deglicosilada se encuentra en el rango de 4 N-glicanos.

Estado intacto			
Masa prom. experimental (Da)	Masa promedio teórica (Da)	Posible compuesto	Intensidad relativa (%)
62975,8	desconocida	n.d.	9,6
63266,8	desconocida	n.d.	7,9
63341,4	desconocida	n.d.	8,3
63633,1	desconocida	n.d.	9,6
63706,7	desconocida	n.d.	10,2
63923,3	desconocida	n.d.	7,9
63997,7	desconocida	n.d.	12,7
64289,0	desconocida	n.d.	14,5
64850,6	desconocida	n.d.	11,4
64870,9	desconocida	n.d.	8,0

**Tabla 12.4: Resultados de determinación de la masa intacta del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5, L: BA45001.**



**Figura 17.4: Zoom de espectro de masa deconvolucionado del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 L:BA45001 en su estado intacto**

### 4.1.5.3 CONCLUSIONES

El antígeno RBDscd Gamma pudo ser exitosamente caracterizado por análisis de masa intacta. Las terminaciones N- y C- se encuentran modificadas por la presencia de un piroglutamato adicional (convertido a partir de la Gln del péptido señal) y la remoción de la lisina terminal respectivamente.

Adicionalmente la molécula se encuentra completamente O-glicosilada, representando Hex2HexNAc2NeuAc2 y Hex2HexNAc2NeuAc3 las especies mayoritarias además de las especies O-glicosiladas menos abundantes Hex2HexNAc2NeuAc1 y Hex2HexNAc2NeuAc4.



Finalmente, la N-deglicosilación incompleta resultó en la presencia de formas N-glicosiladas adicionales.

El antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 pudo ser exitosamente caracterizado por análisis de masa intacta. Las terminaciones N- y C- se encuentran modificadas por la presencia de O-glicosilación en 2 sitios y la remoción de la lisina terminal respectivamente.

La molécula se encuentra completamente O-glicosilada, representando la forma Hex2HexNAc4NeuAc1 la especie mayoritaria en ambos sitios.

El estado intacto mostró un perfil complejo, siendo la masa más abundante identificada 64289,0Da.

## 4.2 ELUCIDACIÓN DE ESTRUCTURAS DE ÓRDENES SUPERIORES

El correcto plegamiento de la molécula de RBDscd variantes Gamma y Ómicron BA.4/5 ocurre si las estructuras secundaria y terciaria se mantienen. La correcta conformación espacial es condición necesaria para que pueda ocurrir la unión específica con el receptor hACE-2 y está directamente relacionada con la capacidad de generación de anticuerpos neutralizantes de la vacuna ARVAC CG.

La verificación de la correcta estructura secundaria y terciaria de la molécula de antígeno RBDscd Gamma ha sido verificada mediante los estudios indicados en la **Tabla 13 (3.2.S.3)**.

ITEM	ESTUDIO/ METODOLOGÍA	ABORDAJE	RESULTADO	OBSERVACIONES
2.1	Análisis de puentes disulfuro y Cys libres por espectrometría de masas.	Directo	Se confirman los 8 puentes disulfuro esperados.	Cys libres ≤ 2%.
2.2	Estudios estructurales: Espectro de Absorción UV y cuarta derivada y Dicroísmo circular	Directo	Las muestras exhiben espectros UV consistentes con los de una proteína plegada. Los espectros de las soluciones de muestra se corresponden con el de la referencia.	Estudio realizado sobre muestras de RBDscd Gamma lotes RBDM001, RBDM002 RBDM003 y referencia interna RTRBD-01 y muestras de RBDscd Ómicron BA.4/5 lotes DBI/RBDOA4/5001 y BA45001.

**Tabla 13.4- Elucidación de las Estructuras Secundaria y Terciaria de los antígenos RBDscd Gamma y RBDscd Ómicron BA.4/5 (Principios Activos)**

### 4.2.1 ANÁLISIS DE PUENTES DISULFURO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Este análisis fue realizado por Protagen Protein Services.

El análisis de puentes disulfuro y Cys libre se llevó a cabo por Cromatografía Líquida (LC) acoplada a Espectrometría de Masas con Ionización tipo Electro spray (ESI-MS) y espectrometría de masa en tándem (MS-MS).

La muestra se analizó en condiciones reductoras y no reductoras luego de digestión enzimática.



### 4.2.1.2 RESULTADOS

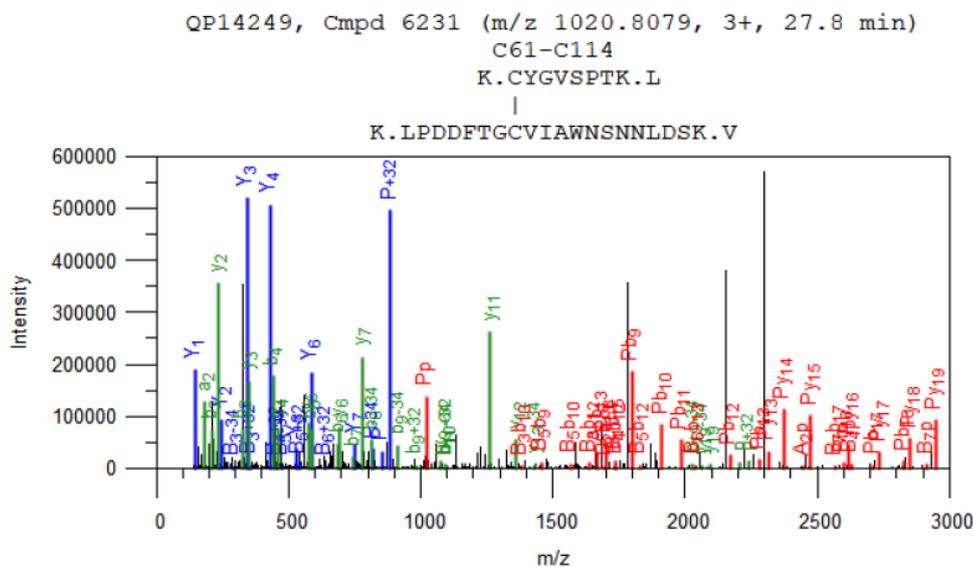
Puentes disulfuro de antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5:

En los espectros masa – masa (MS-MS) de la muestra sin reducir, se determinaron los residuos con puentes disulfuro por detección de los dipéptidos correspondientes. En total, se identificaron los 8 puentes disulfuro esperados, sin embargo, debido a la homología de la secuencia, una distinción de los correspondientes sitios Cys homólogos no es posible. Todos los puentes fueron confirmados por los espectros MS/MS de los péptidos de diferentes largos y cargas conteniendo dichos puentes. Los dipéptidos con puentes disulfuro identificados, fueron confirmados por monitoreo de la aparición diferencial de dichos péptidos en la muestra no reducida respecto de la reducida. No se observaron péptidos con puentes disulfuro en la muestra reducida. Además de los puentes disulfuro esperados, no se detectaron puentes adicionales.

Tipo de puente disulfuro	Cys-Cys	RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001	RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001
Intra-molecular	C18/C237 - C43/C262	✓	✓
Intra-molecular	C61/C280 - C114/C333	✓	✓
Intra-molecular	C73/C292 - C207/C426	✓	✓
Intra-molecular	C162/C381 - C170/C389	✓	✓

**Tabla 14.4: Identificación de puentes disulfuro**

En la **Figura 18.4** se muestra como ejemplo el espectro MS/MS del dipéptido C61/C280- C114/C333 de RBDscd Gamma, lote DBI/RBDM001.



**Leyendas espectrales:**

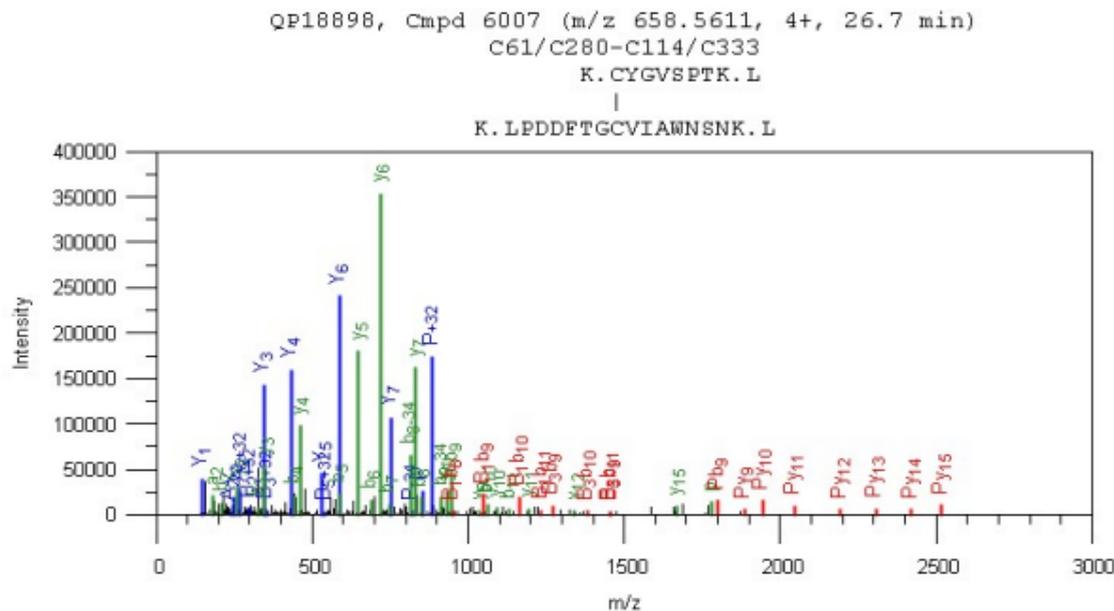
- Señales azules: Fragmentación del 1er. péptido
- Señales verdes: Fragmentación del 2do. péptido
- Señales rojas: Fragmentación del péptido puente.
- Señales con “+32” o “+34”: Fragmentación del puente disulfuro (+/- azufre)



Y/y, B/b, A/a: fragmentos iónicos  $\gamma$ -, b-, a- del 1er. péptido y del 2do. péptido.

**Figura 18.4: Espectro masa masa (MS/MS) de los péptidos con la unión C<sub>61</sub>/C<sub>280</sub>-C<sub>114</sub>/C<sub>333</sub>:K.C<sub>61</sub>/280 YGVSP<sub>TK</sub>.L – K.LPDDFTGC<sub>114</sub>/333VIAWNSNNLDSK.V de muestra RBDscd Gamma lote: DBI/RBDM001**

En la **Figura 19.4** se muestra como ejemplo el espectro MS/MS del dipéptido C<sub>61</sub>/C<sub>280</sub>- C<sub>114</sub>/C<sub>333</sub> de RBDscd Ómicron BA.4/5, lote BA45001.



Leyendas espectrales:

Señales azules: Fragmentación del 1er. péptido

Señales verdes: Fragmentación del 2do. péptido

Señales rojas: Fragmentación del péptido puente.

Señales con “+32” o “+34”: Fragmentación del puente disulfuro (+/- azufre)

Y/y, B/b, A/a: fragmentos iónicos  $\gamma$ -, b-, a- del 1er. péptido y del 2do. péptido.

**Figura 19.4: Espectro masa masa (MS/MS) de los péptidos con la unión C<sub>61</sub>/C<sub>280</sub>-C<sub>114</sub>/C<sub>333</sub>: K.C<sub>61</sub>/280 YGVSP<sub>TK</sub>.L – K.LPDDFTGC<sub>114</sub>/333VIAWNSNNLDSK.V de muestra RBDscd Ómicron BA.4/5 lote: BA45001.**

**Cisteínas libres:**

Dado que los antígenos se trataron inicialmente con el agente alquilante N-etilmaleimida (NEM), todas las Cys libres se detectaron con alquilación NEM.

Fueron identificadas el total de las 16 Cys libres en los espectros MS/MS de las muestras reducidas de los antígenos de las variantes Gamma y Ómicron BA.4/5, sin embargo, debido a la homología de la secuencia, una distinción de las correspondientes Cys homólogas no es posible. Todas las cisteínas libres presentaron una baja abundancia  $\leq 2\%$  para ambos antígenos.

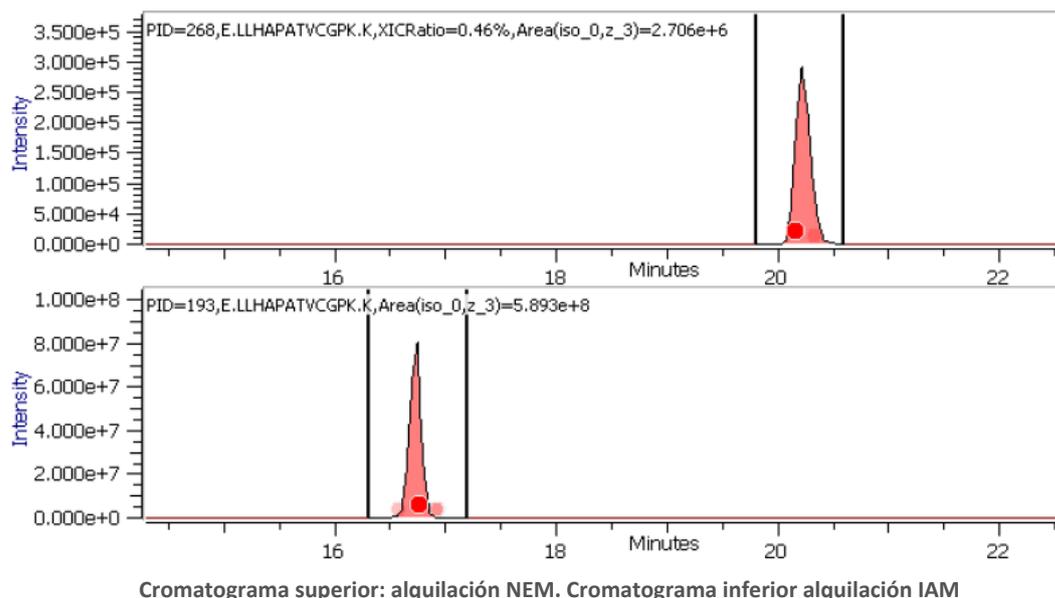


Cisteína	% (*)	
	RBDscd Gamma L: DBI/RBDM001	RBDscd Ómicron BA.4/5 L: BA45001
C18/C237 libres	0,3	0,3
C43/C262 libres	0,2	---
C61/C280 libres	2,0	---
C114/C333 libres	0,8	---
C73/C292 libres	0,7	---
C207/C426 libres	0,3	---
C162/C381 libres	0,9	---
C170/C389 libres	0,4	0,1

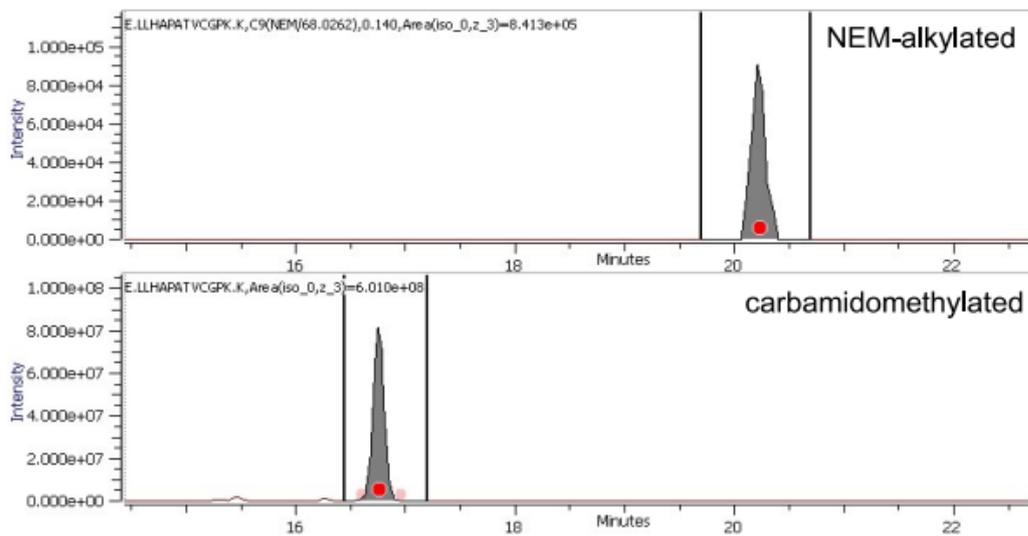
(\*) : los % por MS fueron calculados sin corregir por la eficacia de la ionización de los distintos péptidos y por lo tanto pueden no reflejar los valores reales.

**Tabla 15.4: Identificación y estimación del % de cisteínas libres por XIC (Ion extraction chromatography) del estado alquilado con NEM respecto del carbamidometilado (IAM).**

En las **Figuras 20.4 y 21.4** se muestran como ejemplo la cromatografía de extracción iónica (XIC) del péptido conteniendo C207/C426 con alquilación NEM y IAM para los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5 respectivamente.



**Figura 20.4: XIC del péptido E.LLHAPATVC<sub>207/426</sub>GPK.K de la muestra de RBDscd Gamma lote DBI/RBDM001 con alquilación NEM e IAM.**



**Figura 21.4:** XIC del péptido E.LLHAPATVCGPK.K de la muestra de RBDscd Ómicron BA.4/5 lote BA45001 con alquilación NEM e IAM.

#### 4.2.2.3 CONCLUSIONES

Se confirmaron los 8 puentes disulfuro esperados y no se detectaron puentes disulfuro adicionales desordenados para los antígenos RBDscd de las variantes Gamma y Ómicron BA.4/5. Se detectaron además los 16 residuos de cisteína libres en baja proporción.

#### 4.2.3 ESTUDIOS ESTRUCTURALES: ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV Y CUARTA DERIVADA, DICROÍSMO CIRCULAR

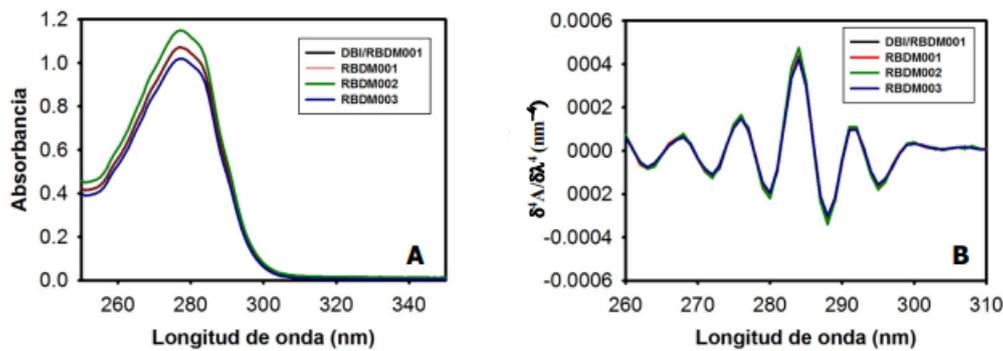
Para el estudio de la estructura secundaria y terciaria de los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4//5, se llevaron a cabo análisis de absorción ultravioleta, análisis de cuarta derivada, fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular (DC).

##### 4.2.3.1 RESULTADOS ANTÍGENO RBDSCD GAMMA:

Para el estudio se analizaron los lotes de antígeno RBDscd Gamma: RBDM001, RBDM002 y RBDM003 respecto de la referencia interna RTRBD-01 (lote DBI/RBDM001).

##### *Absorción ultravioleta*

En la **Figura 22-A.4**, se encuentran graficados los espectros de absorción ultravioleta de las muestras en estudio, y en la **Figura 22-B.4** el análisis de cuarta derivada de los espectros anteriormente mencionados



**Figura 22.4- (A) Espectros de absorción UV (B) Gráfico de la derivada cuarta obtenida a partir de los espectros del panel A.**

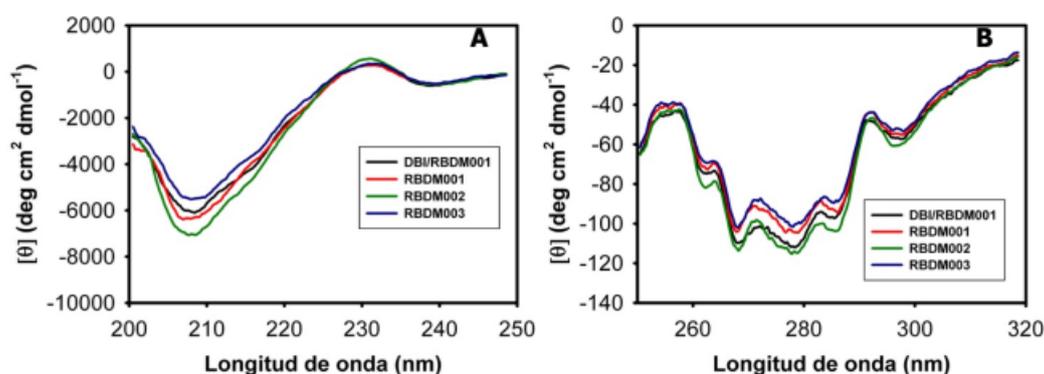
Con respecto a la absorción UV, podemos decir que las muestras exhiben espectros consistentes con los de la proteína plegada. Los máximos corresponden a la estructura vibrónica de las fenilalaninas (240–270 nm), a transiciones no resueltas de tirosina–triptofano (270–285 nm), y a bandas de triptofano (>285 nm). El corrimiento hacia el rojo de estas bandas respecto a los cromóforos aislados correspondientes en solución acuosa es típico del efecto del plegado nativo proteico.

Por otro lado, la ausencia de light scattering, debido a la falta de una pendiente típica entre los 340 y 300 nm, indica que las soluciones proteicas no contienen agregados solubles.

Con respecto al análisis de cuarta derivada, utilizado en este caso para la evaluación de la conformación nativa del antígeno RBDscd Gamma, se observa que los tres lotes son superponibles con la referencia interna, sugiriendo un empaquetamiento similar de los residuos aromáticos.

### Dicroísmo circular

En la **Figura 23-A.4** se encuentran graficados los espectros de dicroísmo circular en la región espectral de UV lejano y en la **Figura 23-B.4** en la región de UV cercano. El propósito de dicho análisis es la evaluación del contenido de estructura secundaria y la integridad de la estructura terciaria.



**Figura 23.14: Espectros de dicroísmo circular en las zonas UV lejana (A) y cercana (B).**

Como se observa en la **figura 23-A.4**, el espectro de DC de UV lejano (sensible a la estructura secundaria) de la referencia interna y de las tres muestras, arrojó una elipticidad mínima negativa única cercana a 208nm, una característica particular de la estructura en lámina- $\beta$ .

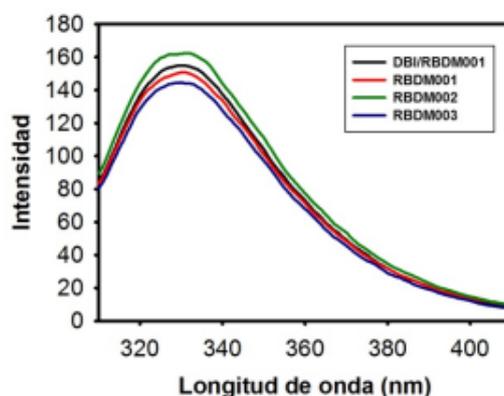


Por otro lado, el espectro en la región cercana 260-320nm (sensible a la estructura terciaria), surge de los aminoácidos aromáticos. Con respecto al estudio de los lotes de antígeno analizados, se observa en la referencia interna y en las tres muestras un pico cercano a 290 nm, correspondientes a residuos de Trp; un pico entre 275 y 282 nm con un hombro más extenso característico de los residuos de Tyr; y los picos entre 255 y 270nm característicos de residuos de Phe (**Figura 23-B.4**).

Del estudio de los espectros de DC de UV lejano y cercano, podemos determinar que los tres lotes de antígeno RBDscd Gamma presentaron una estructura secundaria y terciaria similar entre sí y a la de la referencia interna.

### **Fluorescencia intrínseca**

La hidrofobicidad de las muestras de antígeno RBDscd Gamma fue determinada midiendo las intensidades de fluorescencia extrínseca. En la **Figura 24.4**, se detallan los resultados de los espectros, en los cuales se observa que los máximos de emisión de las cuatro muestras en análisis son coincidentes y se ubican a ~ 330 nm. Este pico máximo a esta longitud de onda es concordante con la alta glicosilación presente en cada uno de los antígenos, lo que produce que los residuos hidrofóbicos de RBD estén poco expuestos al entorno circundante.



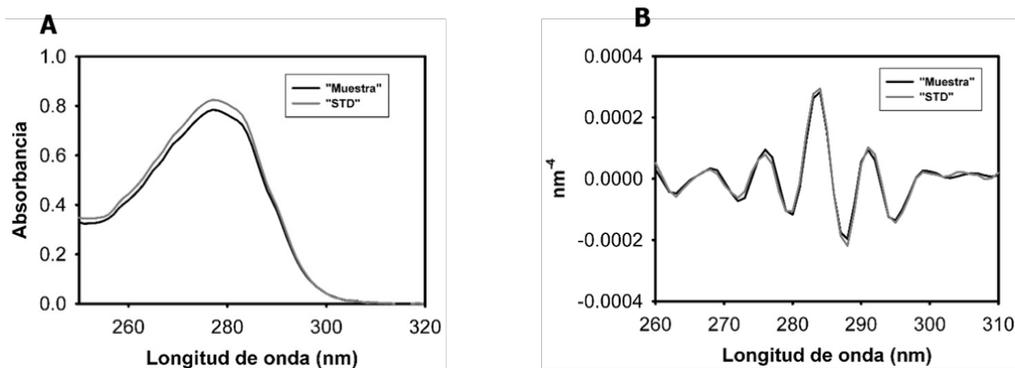
**Figura 24.4: Espectros de emisión de fluorescencia.**

#### **4.2.3.1 RESULTADOS ÓMICRON BA.4/5:**

Para el estudio se analizaron los lotes de antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5: DBI/RBDOA4/5001 (“STD”) y BA45001 (“Muestra”).

### **Absorción ultravioleta**

En la **Figura 25-A.4**, se encuentran graficados los espectros de absorción ultravioleta de las muestras en estudio, y en la **Figura 25-B.4** el análisis de cuarta derivada de los espectros anteriormente mencionados



**Figura 25.4:** (A) Espectros de absorción UV (B) Gráfico de la derivada cuarta obtenida a partir de los espectros del panel A.

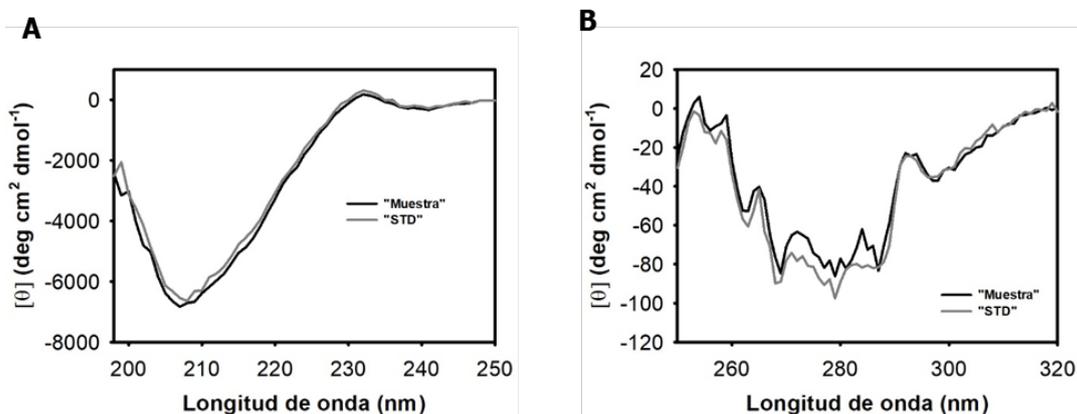
Con respecto a la absorción UV, podemos decir que las muestras exhiben espectros consistentes con los de la proteína plegada. Los máximos corresponden a la estructura vibrónica de las fenilalaninas (240–270 nm), a transiciones no resueltas de tirosina–triptofano (270–285 nm), y a bandas de triptofano (>285 nm). El corrimiento hacia el rojo de estas bandas respecto a los cromóforos aislados correspondientes en solución acuosa es típico del efecto del plegado nativo proteico.

Por otro lado, la ausencia de light scattering, debido a la falta de una pendiente típica entre los 340 y 300 nm, indica que las soluciones proteicas no contienen agregados solubles.

Con respecto al análisis de cuarta derivada, utilizado en este caso para la evaluación de la conformación nativa del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5, se observa que los 2 lotes son superponibles, sugiriendo un empaquetamiento similar de los residuos aromáticos.

### Dicroísmo circular

En la **Figura 26-A.4** se encuentran graficados los espectros de dicroísmo circular en la región espectral de UV cercano y en la **Figura 26-B.4** en la región de UV lejano. El propósito de dicho análisis es la evaluación del contenido de estructura secundaria y la integridad de la estructura terciaria.



**Figura 26.4:** Espectros de dicroísmo circular en las zonas UV lejana (A) y cercana (B).



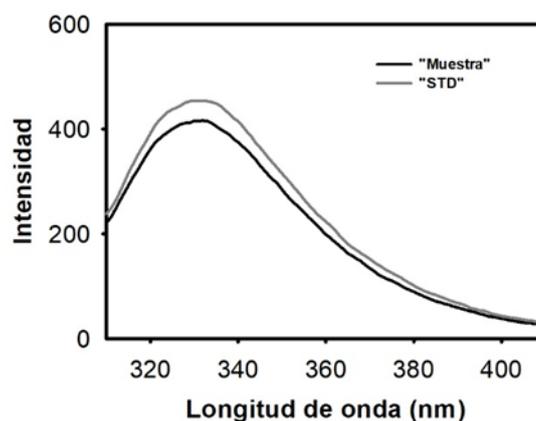
Como se observa en la **figura 26-A.4**, el espectro de DC de UV lejano (sensible a la estructura secundaria) de la referencia interna y de la muestra, arrojó una elipticidad mínima negativa única cercana a 208nm, una característica particular de la estructura en lámina- $\beta$ .

Por otro lado, el espectro en la región cercana, sensible a la estructura terciaria, surge de los aminoácidos aromáticos. Con respecto al estudio de los lotes de antígeno analizados, se observa en la referencia interna y en la muestra un pico cercano a 290 nm, correspondiente a residuos de Trp; un pico entre 275 y 282 nm con un hombro más extenso característico de los residuos de Tyr; y los picos entre 255 y 270nm característicos de residuos de Phe (**Figura 26-B.4**).

Del estudio de los espectros de DC de UV lejano y cercano, podemos determinar que los dos lotes de antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 presentaron una estructura secundaria y terciaria similar.

### Fluorescencia intrínseca

La hidrofobicidad de las muestras de antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5 fue determinada midiendo las intensidades de fluorescencia extrínseca. En la **Figura 27.4**, se detallan los resultados de los espectros, en los cuales se observa que los máximos de emisión de las muestras en análisis son coincidentes y se ubican a  $\sim 330$  nm. Este pico máximo a esta longitud de onda es concordante con la alta glicosilación presente en el antígeno, lo que produce que los residuos hidrofóbicos estén poco expuestos al entorno circundante.



**Figura 27.4:** Espectros de fluorescencia intrínseca en las zonas UV lejana (A) y cercana (B).

### 4.2.3.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en esta sección, se concluye que los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5 estudiados:

- Tienen una conformación nativa similar
- Poseen un empaquetamiento similar de los residuos aromáticos.
- No presentan agregados solubles por ausencia de *light scattering*.
- Presentan estructura secundaria y terciaria similar
- Tienen un máximo de emisión de fluorescencia extrínseca de  $\sim 330$ nm debido a la alta glicosilación presente en cada una de las muestras.



## 4.3 PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS

El dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína Spike es el sitio que se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (hACE2) para mediar la infección viral. Por ello, la mayoría de los anticuerpos neutralizantes reconocen al RBD y esto lo hace un blanco atractivo como antígeno de diseño de vacunas a subunidad contra COVID-19. Los resultados recientes de vacunas contra SARS-CoV-2 basadas en RBD han demostrado que se pueden inducir títulos elevados de anticuerpos neutralizantes en humanos con este tipo de vacunas, siendo el RBD además una fuente de epítopes de células T para inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos y T helper.

La caracterización inmunológica y biológica del principio activo se hizo por medio de los ensayos descritos en la **Tabla 16.3**.

ITEM	ESTUDIO/METODOLOGÍA	ABORDAJE	RESULTADO	OBSERVACIONES
3.1	Caracterización inmunológica: afinidad por el receptor ACE-2 humano.	<i>In vitro</i> .	La afinidad del RBDscd linajes wild type, Gamma y Ómicron BA.4/5 se determina por un ELISA funcional con el RBD inmovilizado en placa y curva de hACE-2.	EC50 <sub>WT</sub> : 31 ng/mL EC50 <sub>GAMMA</sub> : 23 ng/mL
				EC50 <sub>GAMMA</sub> : 20 ng/mL EC50 <sub>ÓMICRON BA.4/5</sub> : 88 ng/mL
3.2	Actividad Biológica	<i>In vitro</i> .	Pegado en un ELISA funcional a hACE2 inmovilizado en placa. EC50 < 150 ng/mL	Ensayo de potencia de la vacuna
3.3	Actividad Biológica	<i>In vivo</i>	Generación de AC's y AC's neutralizantes en ratón. Respuesta inmune celular antígeno específica con producción de IFN-γ e IL-5.	Linajes Wild type y Gamma.
3.3	Actividad Biológica	<i>In vivo</i>	Linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN-γ y TNF-α antígeno específicos. Ensayo de protección generada por inmunización con RBD Gamma en un modelo murino de enfermedad COVID-19 severa	

**Tabla 16.3: Caracterización inmunológica y biológica de los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5.**

### 4.3.1 CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA: AFINIDAD POR EL RECEPTOR ACE-2 HUMANO

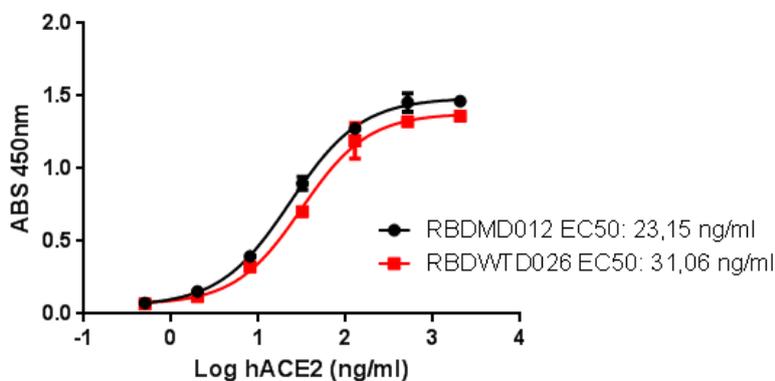
#### 4.3.1.1 RBD GAMMA VS. WILD TYPE

Se determinó la especificidad del RBDscd Gamma por el receptor hACE-2 utilizando un ELISA funcional con el RBDscd inmovilizado en placa y diluciones seriadas de hACE-2. Se comparó la afinidad de los linajes Gamma y wild type (WT) por el receptor.



### 4.3.1.1.2 RESULTADOS

En la **Figura 28.4** se ilustran las curvas dosis respuesta del antígeno RBDscd Gamma, lote RBDMD012 analizado frente RBDscd wild type, lote: RBDWTD026, ambos producidos en Laboratorio Pablo Cassará.



**Figura 28.4: ELISA funcional con RBDscd inmovilizado en placa, linajes Gamma y wild type**

### 4.3.1.1.3 CONCLUSIONES

Los antígenos RBDscd Gamma y wild type inmovilizados en placa se identificaron por su capacidad de pegado en un ELISA funcional con ACE-2 humano, presentando el linaje Gamma una mayor afinidad por el receptor que el wild type (variante ancestral).

### 4.3.1.2 RBD ÓMICRON BA.4/5 VS. RBD GAMMA

Se determinó la especificidad del RBDscd Ómicron BA.4/5 por el receptor hACE-2 utilizando un ELISA funcional con el RBDscd inmovilizado en placa y diluciones seriadas de hACE-2. Se comparó la afinidad de los linajes Ómicron BA.4/5 y Gamma por el receptor.

### 4.3.1.2.2 RESULTADOS

En la **Figura 29.4** se ilustran las curvas dosis respuesta del antígeno RBDscd Ómicron BA.4/5, lote RBDOA4001 analizado frente a la referencia interna de RBDscd Gamma, lote: RTRBD-01, ambos producidos en Laboratorio Pablo Cassará.

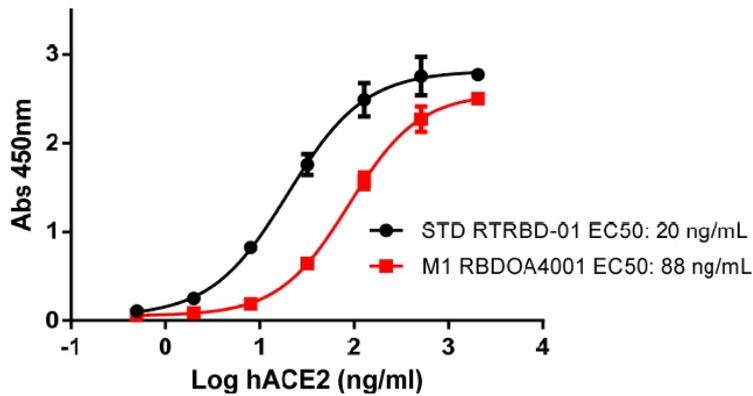


Figura 29.4: ELISA funcional con RBDscd inmovilizado en placa, linajes Ómicron BA.4/5 y Gamma

#### 4.3.1.2.3 CONCLUSIONES

Los antígenos RBDscd Ómicron BA.4/5 y Gamma inmovilizados en placa se identificaron por su capacidad de pegado en un ELISA funcional con ACE-2 humano, presentando el linaje Gamma una mayor afinidad por el receptor que el Ómicron BA.4/5.

#### 4.3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO

La actividad biológica in vitro se determina por medio de un ELISA funcional con hACE-2 humano inmovilizado en placa y diluciones seriadas de RBDscd Gamma.

#### 4.3.2.2 RESULTADOS

A modo de ejemplo se muestran los resultados obtenidos para un lote de principio activo RBDscd Gamma y un lote de principio activo RBDscd Ómicron BA.4/5 usando el programa GraphPad Prism 6.01 y el análisis con el programa estadístico CombiStats™.

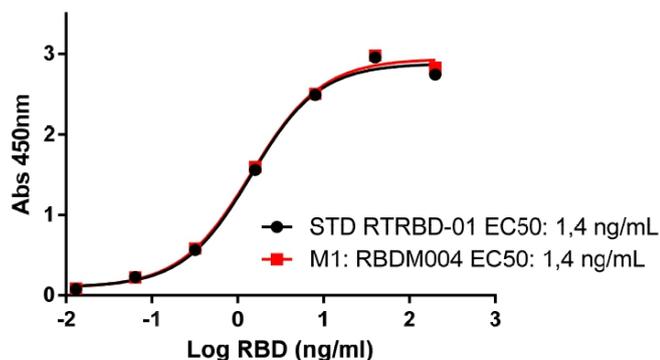


Figura 30.4: ELISA funcional de RBDscd Gamma con h-ACE-2 inmovilizado en placa



Ass. pot.	7.19000 µg/µl
-----------	---------------

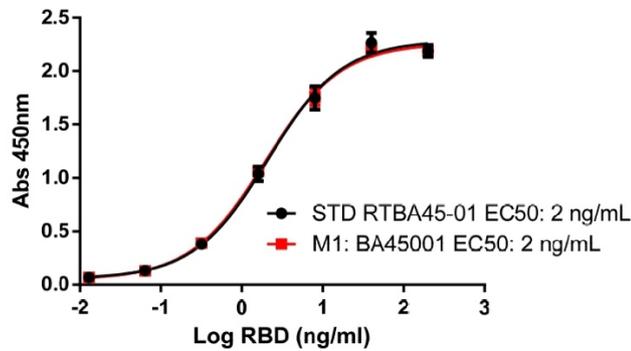
Sample	Info	Lower limit	Estimate	Upper limit	df
1	RBDM004	5.54929	6.39512	7.36949	0
1	RBDM004	6.60437	7.17466	7.79401	0
1	RBDM004	7.17892	7.94332	8.78921	0

Geometric combination  
Homogeneity: p = 0.046

Weighted combination			
(µg/µl)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	6.86583	7.27875	7.71649
Rel. to Ass.	95.5%	101.2%	107.3%
Rel. to Est.	94.3%	100.0%	106.0%

Semi-weighted combination			
(µg/µl)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	6.35390	7.19507	8.14760
Rel. to Ass.	88.4%	100.1%	113.3%
Rel. to Est.	88.3%	100.0%	113.2%

**Figura 31.4: ELISA funcional de RBDscd Gamma lote RBDM004 – análisis cuantitativo con programa estadístico CombiStat**



**Figura 32.4: ELISA funcional de RBDscd Ómicron BA.4/5 con h-ACE-2 inmovilizado en placa**

Ass. pot.	7.25000 µg/µl
-----------	---------------

Sample	Info	Lower limit	Estimate	Upper limit	df
1	BA45001	6.76277	7.31561	7.91366	0
1	BA45001	8.17482	8.60915	9.06659	0
1	BA45001	8.54729	10.0989	11.9335	0

Geometric combination  
Homogeneity: p = 0.000

Weighted combination			
(µg/µl)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	7.96324	8.30356	8.65843
Rel. to Ass.	109.8%	114.5%	119.4%
Rel. to Est.	95.9%	100.0%	104.3%

Semi-weighted combination			
(µg/µl)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	7.07185	8.50956	10.2396
Rel. to Ass.	97.5%	117.4%	141.2%
Rel. to Est.	83.1%	100.0%	120.3%

**Figura 33.4: ELISA funcional de RBDscd Ómicron BA.4/5 lote BA45001 – análisis cuantitativo con programa estadístico CombiStat**



En la **Tabla 17.4** se muestran resultados de Actividad Biológica in vitro para un lote de principio activo RBDscd Gamma y un lote de principio activo RBDscd Ómicron BA.4/5 y sus correspondientes valores de EC50 y potencia relativa combinada respecto al estándar correspondiente.

Estándar RBDscd Gamma (lote)	EC50 (triplicados)	Muestra RBDscd Gamma (lote)	EC50 (triplicados)	Potencia relativa vs. estándar (combinatoria)
RTRBD-01	1 ng/mL	RBDM004	1 ng/mL	100 % (IC 88-113%)
Estándar RBDscd Ómicron BA.4/5 (lote)	EC50 (triplicados)	Muestra RBDscd Ómicron BA.4/5 (lote)	EC50 (triplicados)	Potencia relativa vs. estándar (combinatoria)
RTBA45-01	2 ng/mL	BA45001	2 ng/mL	117 % (IC 82-120%)

**Tabla 17.4: Actividad biológica del antígeno RBDscd Gamma**

#### 4.3.2.3 CONCLUSIONES

El antígeno RBDscd Gamma se identifica por su capacidad de pegado en un ELISA funcional a ACE-2 humano inmovilizado en placa. Se verifica consistencia en los resultados de la EC50 y del análisis estadístico por líneas paralelas sobre 3 lotes de RBDscd Gamma frente a un estándar interno.



## 5. RESUMEN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

### UPSTREAM

- Descongelamiento del vial del banco de células y propagación del cultivo:

Se descongelan criotubos del banco de células respectivo (Gamma u Ómicron BA.4/5) en ( $1 \times 10^7$  cel/vial) en un baño de agua entre 30,0 – 38,0 oC. El contenido es incorporado de manera aséptica a un erlenmeyer que contiene 120-150 mL de Medio de Inóculo Línea CHO-S precalentado a 37oC. El cultivo se deja creciendo en estufa a  $37 \pm 0,2$  oC, gaseada con  $5,0 \pm 0,3$  %  $\text{CO}_2$  y en agitación orbital  $95 \pm 5$  RPM. Durante los días posteriores se determina el recuento y la viabilidad celular. En función de los resultados obtenidos el cultivo se amplifica con Medio de Inóculo (Línea CHO-S), llevando el inóculo a la concentración definida para cada día.

- **Cultivo celular en biorreactor y cosecha:**

Se trata de un proceso de perfusión.

Se utiliza un biorreactor de uso único junto con un sistema de perfusión que contiene una fibra hueca, para la obtención de la cosecha. Esta última es recolectada en bolsas irradiadas de uso único.

El medio de cultivo en el biorreactor se deja a  $37,0 \pm 0,2$  oC a  $90 \pm 2$  RPM hasta la inoculación del mismo. El medio de cultivo utilizado para humectar el sistema de perfusión es descartado.

El inóculo es transferido al biorreactor y, la concentración celular debe ser  $\leq 2,5 \times 10^4$  cel/mL con una viabilidad celular  $\geq 75,0$  %. El cultivo es mantenido en las siguientes condiciones durante el proceso:

- Temperatura:  $37,0 \pm 0,2$  oC
- $\text{pO}_2$ : 50,0 % - Regulada por cascada de ingreso de oxígeno por microsparger.
- Agitación inicial:  $90 \pm 2$  RPM

La perfusión se inicia a una tasa de un volumen de reactor/día cuando la concentración celular es  $\geq 7,5 \times 10^5$  cel/mL y se mantiene en ese valor hasta una densidad celular de  $2,5 \times 10^6$

cel/ml. La tasa de perfusión se ajusta a 1,5 volúmenes/día cuando la densidad celular es  $\geq 2,5 \times 10^6$  cel/ml. Una vez alcanzada la tasa de perfusión de 1,5 volúmenes/día, el cultivo comienza a recibir alimentación extra mediante la adición de medio glucosado.

La tasa de ingreso de medio glucosado se ajusta en función de la concentración de glucosa, de células por mL, de lactato en cultivo y del consumo de glucosa/cel/día.

La tasa de sangrado (descarte parcial de células) de hasta un 15% del volumen de reactor/día se ajusta en función de la concentración y viabilidad celular.

El material cosechado se almacena a 2 – 8 °C.

Controles de proceso: A los 30 minutos posteriores a la inoculación del reactor y luego diariamente, se realiza la toma de muestra para determinar:

- 1) Glucosa
- 2) Lactato
- 3) Células totales (reportar)
- 4) Células viables ( $\geq 75,0$  %).

También se controlan y registran automáticamente por la unidad de control del biorreactor los siguientes parámetros:

- 1) pH
- 2) Temperatura
- 3)  $\text{pO}_2$
- 4) Agitación RPM



## DOWNSTREAM

**Filtración, Diafiltración de la Cosecha:** La cosecha obtenida del biorreactor se almacena y refrigera a 2 a 8 °C en forma estéril. Luego se filtra (poro de 0,45 µm + 0,2µm, membrana filtrante de PES) a un recipiente estéril. El material filtrado se conecta a un sistema de diafiltración tangencial limpio y previamente equilibrado con buffer fosfato. El volumen se concentra con un cassette de bajo pegado proteico (celulosa estabilizada) y corte de 10kDa. A continuación, se diafiltra contra buffer fosfato hasta alcanzar los valores de pH y conductividad determinados. El material se filtra a un recipiente dedicado estéril por medio de un filtro de membrana (PES) de poro 0,45 µm + 0,2 µm y se almacena en cámara fría de 2 a 8 °C.

Controles:

- Filtración de cosecha: presión (Presión ≤ 1,5 kg/cm<sup>2</sup>), Concentración de antígeno RBDscd por RP-HPLC.
- Concentración y diafiltración de cosecha: pH, conductividad y presión.
- Filtración cosecha diafiltrada: presión (Presión ≤ 1,5 kg/cm<sup>2</sup>).

### **Cromatografía 1: Paso de Captura del antígeno RBDscd**

En una columna se empaca por flujo la resina de captura. La columna de afinidad se equilibra primero con buffer fosfato (Buffer A) y luego se siembra el intermediario proveniente del paso anterior. El antígeno RBDscd interacciona con la resina y queda adherido a la misma, gran parte de las impurezas quedan en la fracción no retenida eliminándose directamente. Las moléculas débilmente unidas a la resina son desprendidas con seis volúmenes de columna de solución de lavado. La elución del antígeno se realiza utilizando un gradiente de concentración creciente de NaCl. El eluido se colecta en un contenedor estéril hasta que la señal de absorbancia UV a 280 nm cae por debajo del 5% de la absorbancia máxima observada.

Controles de proceso: Se monitorea el proceso midiendo proteínas totales por UV280nm. Se registra a través del cromatógrafo: UV280 y 260nm, pH y Conductividad. Se calcula el rendimiento.

**Concentración y Diafiltración I:** Se concentra el intermediario al volumen calculado y se diafiltra contra Buffer Diaf I. Para ello, se utiliza un sistema de diafiltración con un cassette de 10 kDa. El retenido final se pasa por un filtro de poro 0,45+0,2 µm para reducir la carga microbiológica y se almacena a 2 – 8 °C en un recipiente estéril.

Controles de proceso: Se monitorea el proceso midiendo proteínas totales por medio de absorbancia de luz UV (longitud de onda = 280nm), pH, conductividad y presión.

### **Cromatografía 2: Reducción de agregados de alto peso molecular y moléculas cargadas negativamente como ADN residual y endotoxinas.**

La resina de intercambio aniónico se regenera con un buffer de alta concentración de NaCl (buffer B) y se equilibra luego con buffer de equilibrado (buffer A). Se siembra el intermediario y se recoge en un recipiente estéril el no retenido (contiene el antígeno RBDscd). Luego se pasan volúmenes de columna de buffer de lavado A y los primeros volúmenes de columna se recogen junto con el no retenido.

Controles: Se monitorea el proceso midiendo proteínas totales por UV280nm. Se registra a través del cromatógrafo: UV280 y 260nm, pH y Conductividad.

**Concentración y Diafiltración 2:** se concentra el intermediario y se cambia a Buffer de Diaf 2. El retenido final se pasa a través de un filtro de poro 0,2 µm para reducir la carga microbiológica y se almacena a 2 – 8 °C en un recipiente estéril.

Controles: Se miden las proteínas por espectrofotometría UV 280nm, pH y conductividad.

### **Cromatografía 3: Pulido del antígeno, por eliminación de proteínas de bajo peso molecular en muy baja concentración.**

El intermediario obtenido en el paso anterior se siembra en la columna conteniendo resina de intercambio catiónico débil previamente equilibrada con buffer A. El antígeno RBDscd al pH utilizado tiene carga positiva



y queda adherido a la columna y los contaminantes de bajo peso molecular se eliminan en la porción no retenida. Luego se lava con buffer A para desprender las moléculas débilmente adheridas. La elución se realiza con un gradiente salino de 0 a 50 % de buffer B y la misma se recoge en fracciones.

Controles: Se monitorea el proceso por señal a UV 280 nm. Se registra a través del cromatógrafo:

UV 280 y 260 nm, el valor de pH y la conductividad.

Se realiza un control por SDS-PAGE de las fracciones eluidas y se confecciona un pool con las fracciones representativas y se controla su pureza.

### CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN 3:

El pool de elución se concentra y se somete a filtración tangencial con buffer de diafiltración final (buffer de formulación del antígeno). El intermediario es almacenado refrigerado de 2-8 °C hasta la filtración final.

Controles: Se miden las proteínas totales por UV 280 nm, pH y conductividad.

### FILTRACIÓN FINAL:

La filtración final se realiza bajo flujo laminar y se emplea un filtro estéril gamma irradiado, de poro 0,22 µm y membrana de PVDF de bajo pegado proteico. El material se filtra a botellas cuadradas Nalgene de PETG estériles y apirógenas y se almacena etiquetado, a  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Controles: Se toman muestras para realizar el control de calidad sobre el Ingrediente farmacéutico activo (IFA) concentrado.



## 6. RESUMEN DE PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PRODUCTO TERMINADO

### GRANEL

Se diseña el proceso y el orden de adición, disolviendo primero los excipientes solubles y dispersando el gel de hidróxido de aluminio en una porción de la solución y agregando el antígeno en otra. Los componentes solubles de la formulación se esterilizan por filtración al transferirlos a un tanque mezclador en área A en B para luego fraccionar la vacuna.

El gel de hidróxido de aluminio se adquiere esterilizado y se agrega en el reactor ya ubicado en el área clase A. El envase original se esteriliza en su exterior aplicando una dosis de 10 KGy de radiación gamma para ingresarlos al área de producción.

Se fijan los parámetros del proceso de elaboración del granel en base a ensayos y a información recogida durante la calificación de equipos. Los parámetros relevantes son las velocidades de agitación en las distintas etapas del proceso, la temperatura y el tiempo de la etapa de adsorción que es crítico para que en la vacuna fraccionada se logre una fracción de antígeno libre no superior al 10 %.

### FRACCIONAMIENTO

Las ampollas y frascos ampolla de vidrio tipo I se despirogenan según un proceso estandarizado.

Los tapones de caucho bromobutilo y sellos de aluminio se autoclavan según proceso estandarizado.

El fraccionamiento se realiza en un área clase A y se fijan los criterios de contenido neto para que el volumen extraíble permita la extracción de las dosis declaradas en cada caso. Durante el fraccionamiento se fija experimentalmente la velocidad de agitación para mantener la suspensión homogénea durante todo el proceso y también se determina el volumen remanente final en tanque mezclador que debe descartarse para asegurar que todas las unidades estén dentro de especificaciones.

Se realiza un análisis de riesgo de las etapas de granel y de fraccionamiento y se establece una estrategia de control que asegura el control del riesgo en las etapas críticas, las cuales se relacionan básicamente con:

- Asegurar la esterilidad de la vacuna, asegurando la de sus componentes y las condiciones asépticas del área de fraccionamiento.
- Asegurar la adsorción del antígeno para lograr una fracción de antígeno libre no superior a 10 % en la vacuna fraccionada.
- Asegurar el contenido neto que permita extraer las dosis.



## 7. RESUMEN DE METODOLOGÍA Y ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

### 1- ASPECTO

Metodología: Inspección visual.

Especificación: Solución clara o ligeramente turbia, incolora.

### 2- pH

Metodología: Método potenciométrico.

Especificación: 7,0 – 7,4

### 3.1- IDENTIFICACIÓN A – VALORACIÓN BIOLÓGICA

Metodología: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Especificación: La proteína se identifica por su capacidad de pegado en un ELISA funcional a ACE2 humano inmovilizado en placa.

### 3.2- IDENTIFICACIÓN B – PUREZA: IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES DIFERENTES

Metodología: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras.

Especificación: La banda principal de la muestra es similar en posición a la banda principal de la referencia.

### 3.3- IDENTIFICACIÓN C – PUREZA: PROTEÍNAS RELACIONADAS

Metodología: HPLC en fase reversa.

Especificación: El pico principal en el cromatograma obtenido con la solución muestra, es similar en tiempo de retención y forma al pico principal en el cromatograma obtenido con la solución de referencia.

### 4.1- IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES DIFERENTES

Metodología: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras.

Especificación: No > 5% de impurezas totales.

### 4.2- PUREZA: PROTEÍNAS RELACIONADAS

Metodología: HPLC en fase reversa.

Especificación: Cualquier impureza: para cada impureza, máximo 2,0%. Totales: máximo 5,0%.

### 4.3- PUREZA: DÍMEROS Y SUSTANCIAS RELACIONADAS DE MAYOR PESO MOLECULAR

Metodología: Cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Especificación: Suma de los picos eluidos antes del pico principal: máximo 2,0 %; desestimar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico principal.

### 4.4- PUREZA: PROTEÍNAS DE CÉLULA HUÉSPED (CHO)

Metodología: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Especificación: No mayor a 0,6%.

### 4.5- PUREZA: ADN DE CÉLULA HUÉSPED

Metodología: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Especificación: No > 10 ng ADN / 50 µg de RBD.



## 5.1- CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Metodología: Espectrofotometría UV.

Especificación: 6,00 – 9,00 mg/mL mg/mL.

## 5.2- VALORACIÓN BIOLÓGICA

Metodología: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) funcional.

Especificación: EC50 < 150 ng/mL.

## 6.1- ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Metodología: LAL cromogénico de punto final.

Especificación: No > 20 UE en el volumen que contiene 1 mg de antígeno RBD.

## 6.2- CONTROL MICROBIOLÓGICO

Metodología: Filtración por membrana.

Especificación: Recuento de aerobios viables totales: No más de 1 UFC/ 10 mL.



## 8. RESUMEN DE METODOLOGÍA Y ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

### 1- RESUSPENSIÓN

Metodología: Inspección visual.

Especificación: Se resuspende fácilmente y se mantiene estable durante aproximadamente 1 minuto.

### 2- ASPECTO DE LA SUSPENSIÓN

Metodología: Inspección visual.

Especificación: Líquido blanquecino turbio.

### 3- pH

Metodología: Potenciometría

Especificación: 6,8 – 7,4

### 4- VOLUMEN EXTRAÍBLE

Metodología: Gravimetría

Especificación: Envase monodosis: No menor a 0,50 mL.

*Envase multidosis: No menor a 10 dosis de 0,50 mL.*

### 5- CONTENIDO DE ALUMINIO

Metodología: Absorción atómica

Especificación: 0,8 – 1,2 mg Al/mL

### 6- ANTÍGENO LIBRE

Metodología: SDS-PAGE No reductor

Especificación: No mayor al 10% de antígeno libre.

### 7- IDENTIFICACIÓN

Metodología: ELISA funcional

Especificación: La proteína se identifica por su capacidad de pegado en un ELISA funcional a ACE2 humano inmovilizado en placa.

### 8- VALORACIÓN BIOLÓGICA

Metodología: ELISA funcional

Especificación: EC50 < 10 ng/mL

### 9.1- ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Metodología: LAL cromogénico de punto final

Especificación: No > 10 UE en el volumen que contiene 50 µg de antígeno RBDscd

### 9.2- ESTERILIDAD

Metodología: Inoculación directa del medio de cultivo.

Especificación: Debe cumplir el ensayo de esterilidad.



## 9. ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Los ensayos realizados fueron aquellos que proveen un perfil de estabilidad, es decir aquellos que aseguran que podrían detectarse cambios en la identidad, potencia y seguridad de la vacuna.

Conclusión: Teniendo en cuenta los resultados obtenidos bajo las condiciones de almacenamiento T: 2-8 °C (los lotes estudiados cumplieron con las especificaciones preestablecidas para todos los tiempos analizados), se le asigna a ARVAC:

**Período de vida útil: 15 meses**

**Condiciones de Conservación: Conservar en su envase original entre 2 y 8 °C. No congelar**

**Estabilidad respecto de excursiones cortas de temperatura** por fuera de la temperatura de conservación indicada en el rótulo, según DI-2023-4061-APN-ANMAT, se realizaron estudios de estabilidad respecto de excursiones en la condición de almacenamiento de 25°C ± 2°C durante 24hs y 1 semana.

Conclusión: Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los Estudios de Estabilidad respecto de excursiones cortas de temperatura por fuera de la temperatura de conservación indicada en el rótulo, bajo las condiciones de almacenamiento T: 25°C ± 2°C (el lote estudiado cumplió con las especificaciones preestablecidas para todos los tiempos analizados).

Se concluye que la vacuna **ARVAC** suspensión inyectable frasco ampolla x 0,5 ml **es estable cuando se la somete a excursiones de temperatura a 25 °C ± 2 °C hasta por 7 días**, en el envase descrito.



## 10.RESUMEN DE ENSAYOS DE INMUNOGENICIDAD EN RATONES

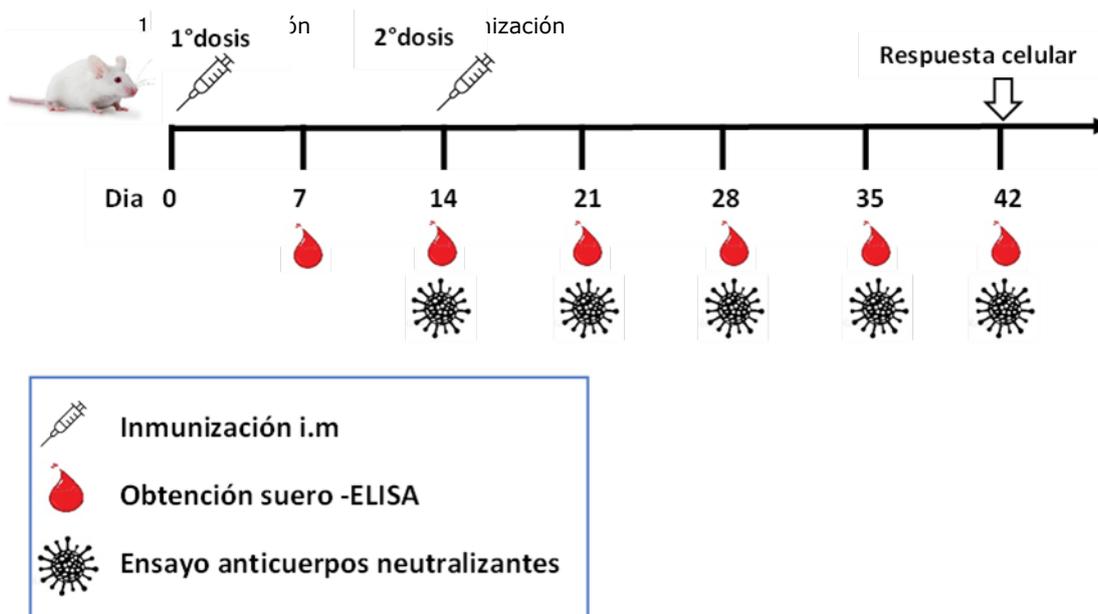
### 10.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN RATONES

Con el fin de determinar la inmunogenicidad del antígeno RBDscd Gamma, se llevaron a cabo distintos ensayos en ratones BALB/c. Dichos ensayos fueron realizados por el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" UNSAM-CONICET.

#### 10.1.1 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Como primer abordaje se realizó un ensayo de evaluación de la respuesta humoral y celular de ratones BALB/C hembras de 8 semanas generada por la inmunización con el antígeno RBDscd. En este caso, se utilizaron dos antígenos RBD, el antígeno RBDscd WT (Lote RBDWTD026) y el RBDscd Gamma o P.1 (Lote RBDM012), adsorbidos en Alhydrogel. Las dosis de antígeno utilizadas, 10 µg de RBD, corresponden a la quinta parte de lo que se plantea utilizar en humanos. Como control negativo, se inmunizaron animales con placebo.

El esquema de inmunización (**Figura 1.10**) consistió en dos inmunizaciones por vía intramuscular (I.M) de 50 µL por pata trasera, a día 0 y 14. Para la determinación de la respuesta humoral, se llevó a cabo una toma de muestra de suero cada 7 días que fueron utilizadas para determinar el título de anticuerpos y de anticuerpos neutralizantes mediante ELISA y reducción del efecto citopático, respectivamente. Al día 42, los animales fueron sacrificados, el bazo removido y utilizado para la evaluación de la respuesta celular.



**Figura 1.10: Esquema de inmunizaciones y toma de muestra.**

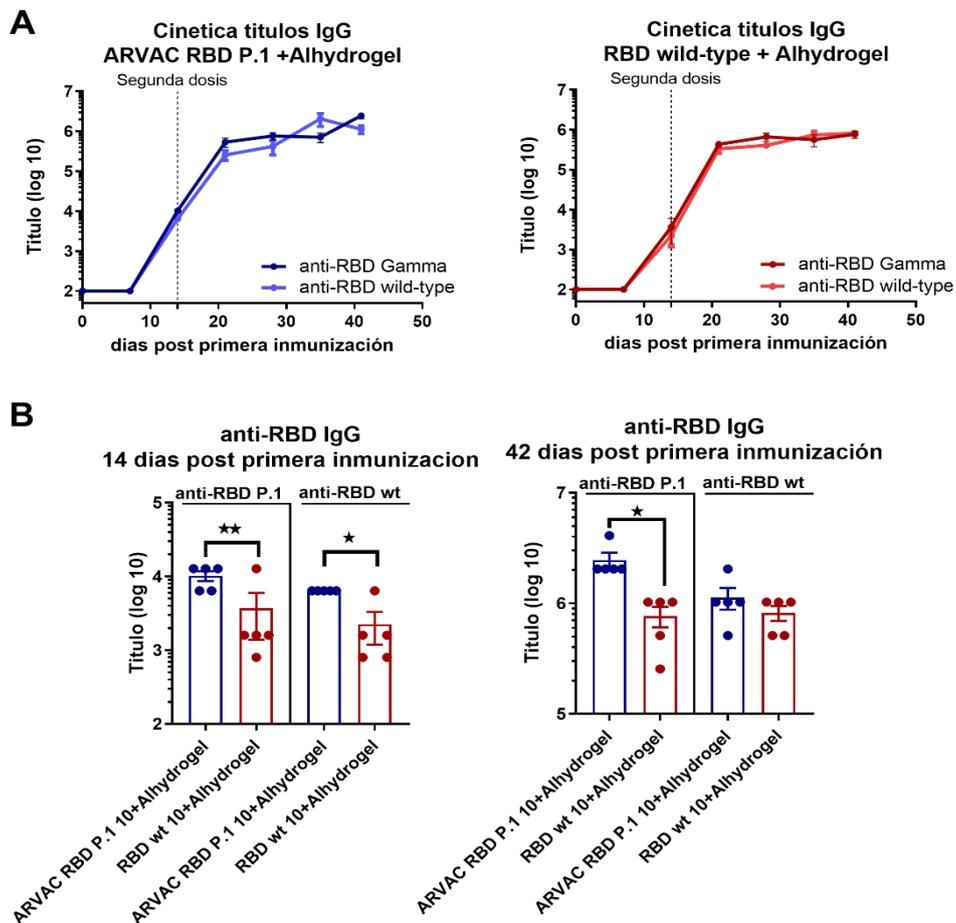


## 10.1.2 RESULTADOS

Como se observa en la **Figura 2.10**, las primeras inmunizaciones con ambos antígenos, indujeron una producción significativa tanto de anticuerpos anti RBD WT como GAMMA. Luego de la segunda inmunización, a los 14 días, la respuesta se incrementa significativamente estabilizándose con elevados títulos de anticuerpos en suero para ambos antígenos (**Figura 3A.10**).

Con respecto a la producción de anticuerpos IgG, se puede observar en la **Figura 3B.10** una mayor respuesta en animales inmunizados con antígeno RBDscd Gamma con respecto a aquellos inmunizados con RBD WT. Asimismo, los animales inmunizados con antígeno RBDscd Gamma producen anticuerpos contra ambas variantes de RBD.

### Respuesta de anticuerpos totales

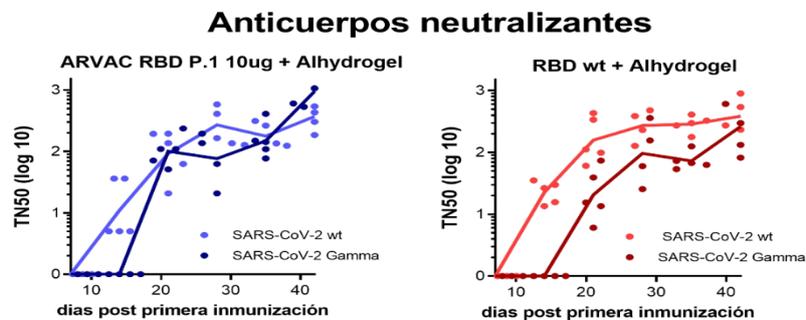


**Figura 3.10: Respuesta de anticuerpos específica IgG anti RBD.**

**A:** Determinación del título de anticuerpos IgG específicos para RBD wt y Gamma (P.1) en el suero de los animales inmunizados, mediante ELISA. Los puntos representan la media  $\pm$  SEM (n=5 animales/grupo). **B:** Título de anticuerpos IgG anti-RBD al día 14 y 42 post primera inmunización. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . T test.



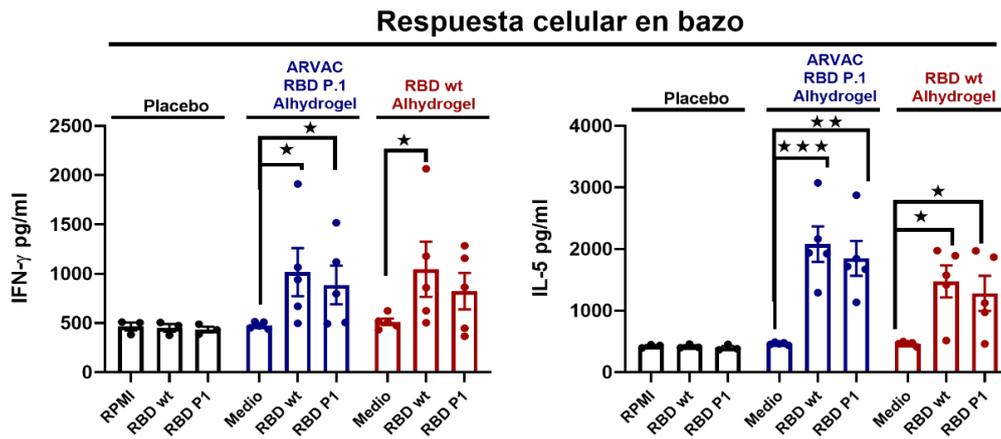
Por otra parte, se realizaron ensayos de seroneutralización del virus SARS-CoV-2 variante ancestral (WT) y Gamma (P.1). Las inmunizaciones con la formulación que contenía el antígeno RBDscd Gamma, indujeron elevados títulos de anticuerpos neutralizantes, tanto de la variante Gamma como de la WT del virus SARS-CoV-2. Sin embargo, la formulación con el RBD WT indujo elevados títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus WT pero niveles significativamente menores de anticuerpos neutralizantes contra la variante Gamma ( $p < 0.05$  TN50 Gamma vs wt día 14 al 35 post primera inmunización) (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10: Anticuerpos neutralizantes contra el virus SARS-CoV-2 wt y la variante P.1. Determinación de la cinética del título de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 Cada punto representa el título neutralizante 50 (IC50) para cada animal y las líneas representan la media geométrica para cada virus (wt o Gamma). (n=5 animales/grupo).**

Para caracterizar la respuesta inmune celular antígeno específica inducida por las inmunizaciones, se estudió *in vitro* la producción de citoquinas de esplenocitos de los ratones inmunizados en respuesta al estímulo con antígenos RBD o sin estímulo (medio completo).

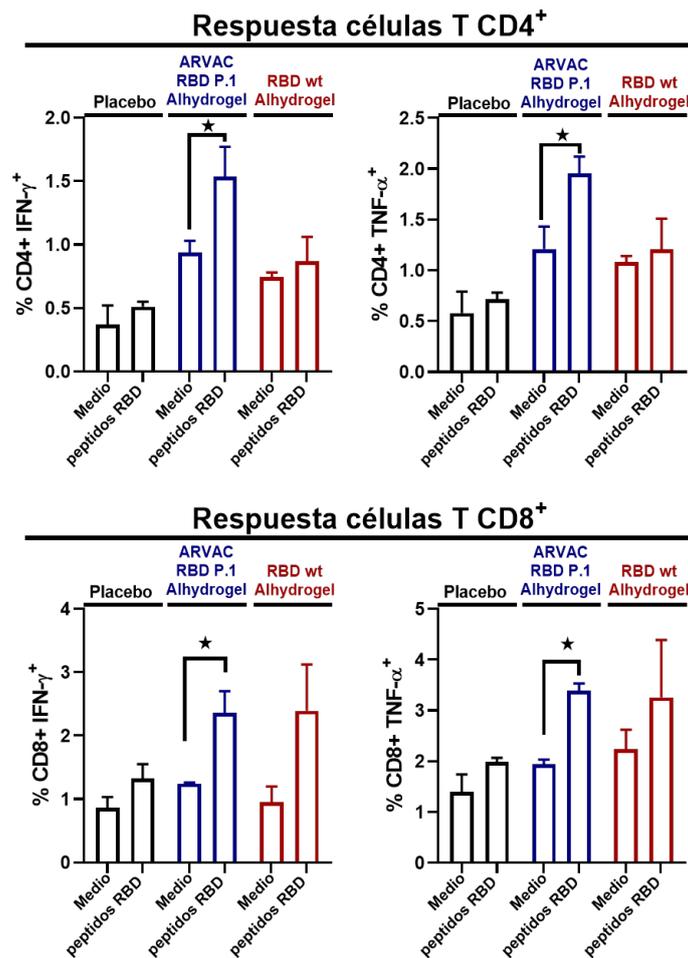
Los esplenocitos de ratones inmunizados con antígeno RBDscd Gamma (P.1) secretaron niveles significativos de IFN- $\gamma$  e IL-5 luego de la estimulación con ambos antígenos RBD (RBD WT y Gamma) en comparación con aquellos que fueron estimulados con el medio completo sin antígenos. Por otro lado, los esplenocitos de los ratones inmunizados con RBD WT secretaron niveles significativamente altos de IL-5 luego de la estimulación con ambos antígenos; sin embargo, solo se observó secreción de niveles significativos de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación con RBD WT. En línea con lo esperado, aquellos animales inmunizados con el placebo no presentaron respuesta inmune celular antígeno específica (**Figura 5.10**).



**Figura 5.10: Respuesta celular en esplenocitos: Niveles de IFN-γ e IL-5.**

**Determinación de niveles de IFN-γ e IL-5 en sobrenadante de esplenocitos. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni). Cada animal se muestra como un punto individual. Las barras corresponden a la media  $\pm$  SEM).**

Con respecto a la respuesta celular generada por las inmunizaciones con el antígeno RBD WT y antígeno RBDscd Gamma, se evaluó la producción de IFN-γ y TNF-α por citometría de flujo a nivel intracelular en los linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+. Para ello, los esplenocitos obtenidos de los bazos de los ratones inmunizados, fueron estimulados con medio completo sin antígenos o con una mezcla de RBDs (péptidos derivados de RBD, RBD WT y RBD Gamma). Los esplenocitos de ratones inmunizados con RBD WT no presentaron un incremento significativo de LT CD4+ o CD8+ productores de IFN-γ y TNF-α antígeno específicos. Sin embargo, los esplenocitos de los animales inmunizados con antígeno RBDscd Gamma, mostraron una producción significativa antígeno específica de IFN-γ y TNF-α tanto en LT CD4+ como en LT CD8+, al ser estimulados con la mezcla de RBDs. Por el contrario, como era de esperar los animales inmunizados con placebo no indujeron una respuesta inmune celular antígeno específica. (**Figura 6.10**).



**Figura 6.10: Respuesta de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IFN-γ y TNF-α**  
**Determinación de células previamente marcadas con anticuerpos específicos para IFN-γ, TNF-α, CD4 y CD8 y analizadas por citometría de flujo. Las barras corresponden a la media ± SEM). (\*p<0,05; ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Bonferroni).**

Los resultados obtenidos validan la selección del antígeno RBD Gamma por sobre el WT, dado que la formulación seleccionada demostró inducir una respuesta humoral (anticuerpos IgG y neutralizantes) y celular (producción de IFN-γ e IL-5 y LT T CD4+ y CD8+ productores de IFN-γ y TNF-α) más robusta que la formula con el RBD WT.

## 10.2 ENSAYO DE PROTECCIÓN GENERADA POR INMUNIZACIÓN CON RBD GAMMA EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD COVID-19 SEVERA

Con el objetivo de evaluar la capacidad de la formulación de la vacuna con antígeno RBDscd Gamma (P.1) de inducir protección frente al desafío experimental del virus SARS-CoV-2, se llevó un experimento en un modelo murino de enfermedad COVID-19 severa. Estos experimentos fueron realizados en el Laboratorio Virginia Tech USA, utilizando los ratones transgénicos K18-hACE2 que expresan el ACE2 humano.

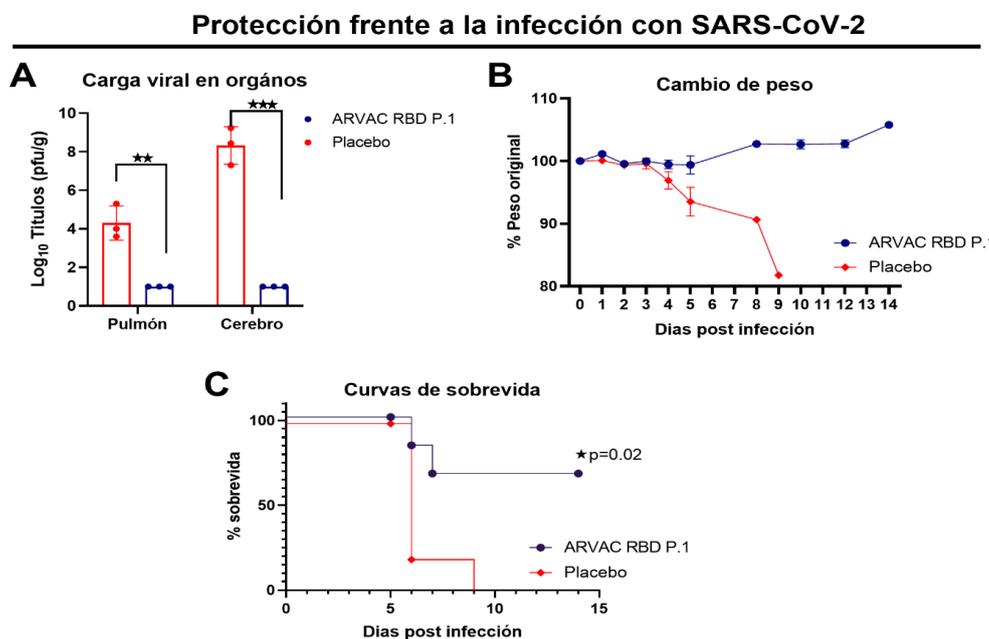


## 10.2.1 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Los animales K18-hACE2 fueron inmunizados a día 0 y 14 por vía I.M con una dosis de 10 µg antígeno RBDscd Gamma (P.1) adsorbido en Alhydrogel y como control se utilizó placebo. Treinta días posteriores a la última inmunización, los animales fueron desafiados con  $2 \times 10^5$  PFU SARS-CoV-2 por vía intranasal. A los cinco días post infección algunos animales fueron sacrificados con el fin de evaluar la carga viral en pulmones y cerebro. El peso de los animales fue registrado a lo largo del experimento.

## 10.2.2 RESULTADOS

Los animales inoculados con placebo presentaron carga viral tanto en cerebro como en pulmón, luego del desafío con el virus SARS-CoV-2 por vía intranasal. En cambio, los animales inmunizados con el antígeno RBDscd Gamma presentaron baja presencia de carga viral en los órganos mencionados, demostrando una protección significativa frente al virus. Por otra parte, los animales inmunizados con el antígeno RBDscd Gamma, no presentaron fluctuaciones significativas en el registro del peso corporal luego de la infección con el virus y la sobrevida fue significativamente mayor que aquellos animales que solo habían recibido placebo (**Figura 7.10**).



**Figura 7.10: Protección frente a la infección con SARS-CoV-2.**

30 días después de la última inmunización los animales fueron desafiados por vía intranasal con virus SARS-CoV-2 wt. Al día 5 se sacrificaron algunos animales y se determinó el título viral en pulmón y cerebro (A)  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  T test. Registro del cambio porcentual del peso (B) y la sobrevida (C) de los animales. ( $*p = 0.0208$  1/5 ARVAC CG 50 vs placebo; Log-rank Mantel-Cox).



### 10.2.3 CONCLUSIÓN

La inmunización con el antígeno RBDscd Gamma demostró un protección robusta y consistente frente al desafío con el virus SARS-CoV-2 aumentando la sobrevivencia de los animales y evitando la carga viral en órganos de relevancia como el cerebro y los pulmones.

### 10.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN RATONES – RBDSCD GAMMA Y ÓMICRON BA.4/5

Con el fin de determinar la inmunogenicidad comparativa de los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron, se llevaron a cabo distintos ensayos en ratones BALB/c. Dichos ensayos fueron realizados por el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" UNSAM-CONICET.

#### 10.3.1 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Se realizó un ensayo de evaluación de la respuesta humoral y celular de ratones BALB/C de 8 semanas generada por la inmunización con los antígenos RBDscd Gamma y Ómicron BA.4/5. En este caso, se utilizaron el antígeno RBDscd Gamma Lote RBDM002 y el antígeno RBDscd Ómicron lote D/DBI/RBDOA4/5001, adsorbidos en Alhydrogel. Las dosis de antígeno utilizadas, 10 µg de RBD, corresponden a la quinta parte de lo que se plantea utilizar en humanos. Como control negativo, se inmunizaron animales con placebo.

Se prepararon tres formulaciones de vacuna conteniendo los antígenos RBDscd Gamma 50 µg, RBDscd Ómicron BA.4/5 50 µg y mezcla de 25 µg de cada uno de los antígenos. Se administraron las formulaciones en ratones según la **tabla 1.10** y se determinaron los niveles de anticuerpos específicos totales y anticuerpos neutralizantes contra distintas variantes del virus SARS-CoV-2 y la respuesta inmune celular antígeno específica.

Grupos	Formulaciones de vacuna	Vía	Inmunización	Dosis ratón	N
G1	Antígeno Gamma 50 µg	IM	d0- d14	1/5 dosis humana	6
G2	Antígeno Ómicron BA.4/5 50 µg	IM	d0- d14	1/5 dosis humana	6
G3	(Antígeno Gamma 25 µg + Antígeno Ómicron BA.4/5 25 µg)	IM	d0- d14	1/5 dosis humana	6

**Tabla 1.10: Esquema de inmunizaciones.**

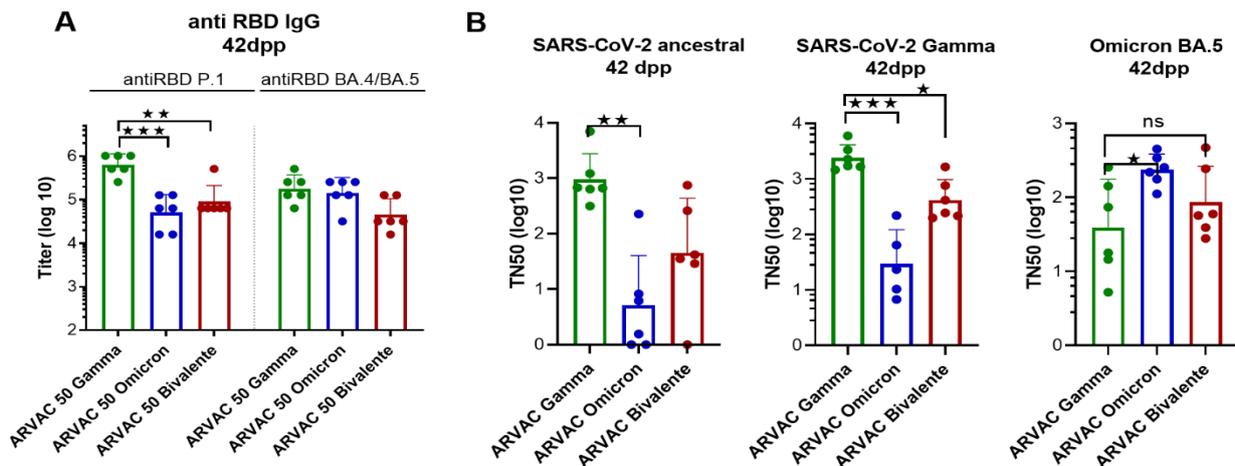
#### 10.3.2 RESULTADOS

Los resultados obtenidos indican que la formulación con antígeno Gamma induce niveles significativamente mayores de anticuerpos específicos anti-RBD Gamma que la formulación con la variante Ómicron BA.4/5 ó la formulación con ambas variantes. Mientras que al evaluar los anticuerpos IgG anti-RBD Ómicron BA.4/5, las tres formulaciones indujeron títulos similares (**Figura 8–A.10**).

Con respecto a los niveles de anticuerpos neutralizantes, la formulación con antígeno Gamma fue superior para neutralizar el virus ancestral o Wuhan y variante Gamma frente a las demás formulaciones. Sin embargo, frente a la variante Ómicron, la formulación conteniendo antígeno Ómicron BA.4/5 fue superior y las



formulaciones conteniendo antígeno Gamma y la mezcla de ambos antígenos presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes similares, aunque menores a la formulación conteniendo antígeno ÓmicronBA.4/5 (*Figura 8–B.10*).



**Figura 8.10: Respuesta inmune humoral en animales inmunizados con las distintas fórmulas vacunales.**

**Animales BALB/c (N=6 por grupo) fueron inmunizados con dos dosis de i) Gamma RBD (10 µg) adyuvada ii) Ómicron RBD (10 µg) adyuvada iii) gamma RBD (5 µg) + Ómicron RBD (5 µg) adyuvada por vía im cada 14 días. A. Determinación del título de anticuerpos IgG anti-RBD (Gamma (P.1) u Ómicron BA.4/5) 42 días post inmunización primaria en el suero de los animales.**

**B. Anticuerpos neutralizantes del virus ancestral, Gamma u Ómicron BA.4/5 en suero de los animales inmunizados (42dpp). Los resultados están expresados en TN50±SD. One-Way ANOVA. Kruskal Wallis post-test**



## 11. RESUMEN DE ESTUDIOS NO CLÍNICOS DE SEGURIDAD DE LA FÓRMULA VACUNAL EN RATÓN Y CONEJO

Para los ensayos preclínicos de seguridad y toxicidad se utilizó la dosis máxima de los candidatos vacunales previstos para los estudios clínicos (50 µg de antígeno en la formulación final conteniendo gel de hidróxido de aluminio y buffer salino). El volumen administrado a los ratones corresponde a 1/5 de la dosis prevista para su uso final en humanos, de modo tal que la dosis por kg de peso (mg/kg) utilizada fue, al menos, unas 750 veces mayor a la que se usará en estudios clínicos (suponiendo 70 kg de peso para el humano adulto y 19 g para el ratón). Asimismo, en el estudio de toxicidad por administración reiterada se realizó un número de administraciones superior al que se realizará en los estudios clínicos, es decir, 3 dosis vacunales (Nota: en los estudios clínicos se aplicarán como máximo dos dosis a cada voluntario).

El ratón se considera un modelo apto para estudiar la toxicidad de la vacuna en tanto es una especie en la que se desarrollan todos los procesos inflamatorios necesarios para el desarrollo de una respuesta inmune, siendo estos procesos inflamatorios los causantes habituales de los efectos adversos que se suelen observar. Sumado a ello se dispone de numerosos estudios previos que demuestran que el ratón es una especie relevante para la evaluación de vacunas, ya que desarrolla tanto respuesta celular como humoral. Además, en el apartado 4.2.2 se han incorporado los datos de un estudio de inmunogenicidad en ratones de la vacuna ARVAC en sus versiones Gamma, Ómicron BA.4/5 y la bivalente Gamma + Ómicron BA.4/5 aplicada en una dosis que es 1/5 de la dosis humana que equivale a una dosis de antígeno total de 10 µg por animal. Este estudio muestra que en sus tres versiones ARVAC es capaz de generar inmunidad humoral y celular específica contra SARS-CoV-2 en sus diferentes variantes.

Si bien los estudios de toxicidad se realizaron con la vacuna ARVAC en su versión Gamma, se consideran válidos para otras versiones de ARVAC con antígenos RBDscd de otras variantes tales como Ómicron BA.4/5 o una mezcla de Gamma + Ómicron BA.4/5.

### A) TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA EN RATONES

El estudio de toxicidad por administración única en ratones contempló una administración de una única dosis del candidato vacunal en un grupo comparada con un grupo control negativo (solución salina); empleando 20 animales por cada formulación (vacuna o placebo). El sacrificio se realizó 3 días luego de la administración. El protocolo fue registrado bajo el número CMC-1380/21.

### CONCLUSIONES

No se evidenciaron efectos clínicos relevantes en los animales tratados.

Las lesiones macroscópicas y las reacciones leves locales se han descrito previamente para adyuvantes similares (Warfving et al, 2017) y se pueden asociar también al volumen de las sustancias administradas. Las diferencias evidenciadas en la cuantificación de plaquetas se consideran un hallazgo eventual ya que se evidencia en el grupo control y en un solo sexo. Sumado a ello, las variaciones con respecto a los valores de referencia fueron leves. Los cambios en pesos relativos de algunos órganos, no se correlacionaron con lesiones macroscópicas.



Los hallazgos a la necropsia se correlacionaron con la histopatología, resultando en su mayoría lesiones leves o de tipo "background".

**Todos los hallazgos descriptos pueden ser considerados como no adversos, siendo una respuesta normal a la administración de vacunas y adyuvantes.**

## **B) TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN REITERADA EN RATONES CON RECUPERACIÓN**

El estudio contempló tres administraciones de la formulación correspondiente a cada grupo: candidato vacunal, control de activo o control negativo; en 30 animales por formulación, con 3 administraciones en días 0, 14, 28. El protocolo fue registrado bajo el número CMC-1379/21.

### **CONCLUSIONES**

No se evidenciaron efectos clínicos relevantes en los animales tratados.

Las lesiones macroscópicas y las reacciones leves locales se han descrito previamente para adyuvantes similares (Warfving et al, 2017) y se pueden asociar también al volumen de las sustancias administradas. Las diferencias evidenciadas en la cuantificación de plaquetas se consideran un hallazgo eventual ya que se evidencia en el grupo control y en un solo sexo. Sumado a ello, las variaciones con respecto a los valores de referencia fueron leves.

Las escasas lesiones observadas en el estudio histopatológico en animales de todos los grupos evaluados se consideran como lesiones de tipo "background", no relacionadas a los tratamientos ya que son hallazgos ocasionales en animales de laboratorio.

**Todos los hallazgos descriptos pueden ser considerados como no adversos, siendo una respuesta normal a la administración de vacunas y adyuvantes.**

### **C1) TOLERANCIA LOCAL EN RATONES**

Se evaluó la tolerancia local en los ratones inmunizados como parte de los ensayos de toxicidad de una dosis y de dosis repetidas. Se realizó durante la evaluación clínica diaria y al finalizar los ensayos el sitio de inyección, tanto en los animales de una única dosis como en los de múltiples dosis y en el grupo de recuperación. También se evaluó la histopatología del sitio de inyección.

### **RESULTADOS**

Este estudio se incluyó en los protocolos registrados bajo los números CMC-1379/21 y CMC- 1380/21.

En conjunto los hallazgos a la necropsia se correlacionaron con la histopatología, resultando en su mayoría lesiones leves o de tipo "background". Las lesiones macroscópicas y las reacciones leves locales se han descrito previamente para adyuvantes similares (Warfving et al, 2017) y se pueden asociar también al volumen de las sustancias administradas.

**Todos los hallazgos descriptos pueden ser considerados como no adversos, siendo una respuesta normal a la administración de vacunas y adyuvantes.**



## C2) TOLERANCIA LOCAL EN CONEJOS

Se realizó en conejos el ensayo de irritación Dérmica Primaria (basado en las guías OECD 404 - OPPTS 870.2400 - ISO 10993-10 con modificaciones por tratarse de una vía diferente de administración).

### RESULTADOS

La administración de las sustancias se realizó sin inconvenientes ni desvíos. Los animales fueron observados diariamente, no evidenciándose alteraciones clínicas en ningún animal. En todos los casos la temperatura de los animales no fue superior a la fisiológica (valor de referencia Zuñiga y col, 2001: 38.5°C - 39.5°C).

Necropsia: No se hallaron lesiones macroscópicas relevantes en ningún animal.

Estudio histopatológico: En dos animales del grupo control de principio activo (placebo) se evidenciaron reacciones leves, similares a las que han sido descritas previamente para adyuvantes similares (Feng, S. et al., 2021). Estas se pueden asociar también al volumen de sustancias administradas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que no se evidencian reacciones locales relevantes asociadas al principio activo.

**Todos los hallazgos descriptos pueden ser considerados como no adversos, siendo una respuesta normal a la administración de vacunas y adyuvantes.**



## 12. RESUMEN DE DESARROLLO CLÍNICO

### ESTUDIO CLÍNICO DE FASE I: ARVAC-F1-001

ARVAC-F1-001 fue un estudio abierto, prospectivo de fase 1 en voluntarios sanos de 18 a 55 años, previamente vacunados con un esquema primario completo contra el virus SARS-CoV-2, con la última dosis aplicada al menos 4 meses antes del ingreso al estudio. Los participantes recibieron dos aplicaciones de ARVAC con dos concentraciones diferentes de antígeno RBD dímero de la variante Gamma: 25 µg y 50 µg. Se asignaron 60 voluntarios para recibir dos aplicaciones con 25 µg de antígeno cada una y 20 para recibir dos aplicaciones con 50 µg de antígeno cada una. El objetivo primario de este estudio fue la seguridad.

#### Se monitorearon los siguientes parámetros de seguridad:

- Reacciones locales durante los 7 días posteriores a la administración de cada dosis de vacuna.
- Reacciones sistémicas durante los 7 días siguientes a cada dosis de vacuna.
- Eventos adversos (EA) desde la aplicación de la primera dosis hasta 1 mes después de la última dosis.
- Eventos adversos serios (EAS) desde la aplicación de la primera dosis hasta 6 meses después de la última dosis.
- Alteraciones en los laboratorios respecto de un control basal, a días 7, 28 y 56 luego de la aplicación de la primera dosis de vacuna. A los 365 días de la primera dosis de vacuna, se realizará un control de laboratorio adicional.

#### Se determinaron los siguientes parámetros de inmunogenicidad de la vacuna:

- Título de anticuerpos neutralizantes (título de media geométrica – GMT) 14 y 28 días posteriores a cada una de las dosis de vacuna (días 0, 14, 28, 42 y 56).
- Título de anticuerpos específicos totales al día 1 (anterior a la primera dosis de vacuna) y a los 28 días posteriores a cada dosis de vacuna (días 28 y 56).
- Respuesta inmune celular, células productoras de IFN gamma e IL-4 específicas dirigidas al RBD de la espícula viral, al día 1 (previo a la primera dosis) y a los 28 días posteriores a cada dosis de vacuna (día 28 y 56).
- Variación del título de anticuerpos neutralizantes respecto del basal luego de cada una de las dosis de vacuna.
- Proporción de voluntarios que alcance un aumento del título de anticuerpos neutralizantes  $\geq 2$  y  $\geq 4$  veces respecto del basal luego de cada una de las dosis de vacuna.

En el estudio 60 participantes fueron asignados a recibir dos aplicaciones de ARVAC de 25 µg y 20 participantes, a recibir 2 dosis de 50 µg. De los 80 voluntarios, 3 (1 del grupo de 25 µg y 2 del grupo de 50 µg) no completaron el esquema de vacunación por motivos personales.

La población de seguridad incluyó a todos los voluntarios que recibieron al menos una dosis de la vacuna en estudio.

El estudio de fase 1 se realizó de acuerdo con las buenas prácticas clínicas y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Durante el desarrollo del estudio, no se han reportado eventos adversos serios asociados a la vacuna en estudio. Los eventos adversos reportados fueron clasificados de la siguiente manera:



**- Reacciones locales:**

- muy frecuentes (más de 1/10): sensibilidad/molestia, dolor espontáneo e hinchazón/induración.
- frecuentes (entre 1/100 y 1/10): eritema/enrojecimiento y prurito/picazón.

**- Reacciones Sistémicas:**

- muy frecuentes (más de 1/10): somnolencia, dolor de cabeza/cefalea, sensación de cansancio/fatiga/decaimiento y dolores musculares/mialgias.
- frecuentes (entre 1/100 y 1/10): escalofríos, dolores articulares, náuseas, diarrea, palpitaciones, fiebre y vómitos, síndrome gripal, erupción en cuello, espalda y tronco, insomnio, mareos, dolor de garganta, acidez estomacal, dolor abdominal, sudor nocturno, ardor en los ojos, congestión nasal.

Todos los eventos reportados fueron de intensidad leve o moderada. **No se reportaron eventos de intensidad de grado 3 o superior.**

- Con relación a los controles de laboratorio, no se han detectado variaciones clínicamente significativas ni con las dosis de 25 µg ni con las dosis de 50 µg. De cada una de las determinaciones realizadas, el valor de la media poblacional se encontró siempre dentro del rango normal del laboratorio, en cada uno de los puntos de control. Ninguna variación ha tenido significancia clínica con ninguna de las dos dosis estudiadas. Las alteraciones de laboratorio individuales más frecuentes detectadas en los distintos puntos de evaluación fueron variaciones hematológicas inespecíficas y aumento de la proteína C reactiva. La severidad en todos los casos fue de grado 1, leve y no se detectaron diferencias entre las dosis de 25 µg y 50 µg.

En cuanto a inmunogenicidad los resultados más significativos se presentan en la **tabla 1 (2.5)**.

**Tabla1.12: Inmunogenicidad humoral luego 1 aplicación de vacuna**

Parámetro	Variante					
	Wuhan		Gamma		Ómicron BA.1	
	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
GMR a los 14 días	12,6x	29,9x	16,6x	30,9x	12,8x	29,9x
% seroconversión a los 14 días	88,3	90,0	90,0	85,0	93,3	85,0
GMR a los 28 días	9,23x	14,2x	8,5x	12,7x	8,91x	14,25x
% seroconversión a los 28 días	82,8	83,3	75,9	83,3	75,9	83,3

GMR = cociente entre la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes luego de vacunación y antes de vacunar.

% seroconversión = porcentaje de participantes que multiplicó su título de anticuerpos neutralizantes al menos 4 veces respecto del valor basal.



## En cuanto a la inmunogenicidad celular:

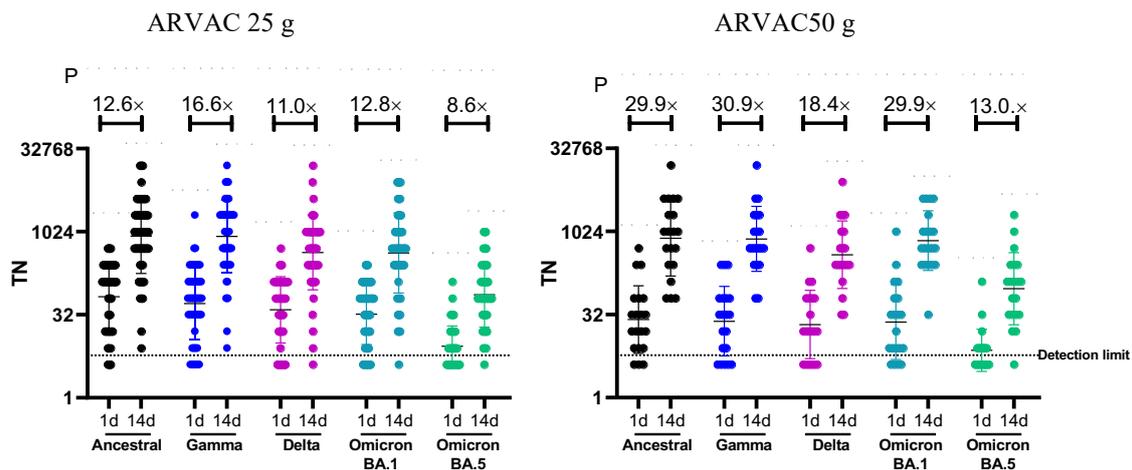
- A los 28 días de recibida una dosis de ARVAC variante Gamma 25 µg la frecuencia de linfocitos T específicos secretores de IFN-γ medida por el método ELISPOT pasó de una media de 18,66 ± 3,55 spots/millón de PBMCs (células de sangre periféricas mononucleadas) a a 65,55 ± 14 spots/millón de PBMCs. (p < 0,0001 para la dosis de 25 µg).

- A los 28 días de recibida una dosis de ARVAC variante Gamma 50 µg la frecuencia de linfocitos T específicos secretores de IFN-γ medida por el método ELISPOT pasó de una media de 12,24 ± 3,15 spots/millón de PBMCs (células de sangre periféricas mononucleadas) a a 31,13 ± 7,54 spots/millón de PBMCs. (p= 0,0302 para la dosis de 50 µg).

Además, a modo exploratorio se determinó la inmunogenicidad de ARVAC en su versión Gamma contra otras variantes del virus SARS-CoV-2 no incluidas en el protocolo, observándose que la vacuna con variante Gamma resultó inmunogénica contra todas las variantes ensayadas, con una amplia respuesta inmunogénica.

Los resultados obtenidos se resumen en la **figura 1.12**

**Figura 1.12: Inmunogenicidad contra distintas variantes del virus SARS-CoV-2 luego de 14 días de recibir ARVAC en su versión Gamma medida como efecto multiplicador del título basal de anticuerpos neutralizantes. (Estudio de Fase 1)**



El estudio de fase 1 de ARVAC variante Gamma se ha publicado recientemente en línea en la prestigiosa revista revisada por pares Nature Communications y se puede hallar en <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40272-3>.<sup>14</sup>

Como se puede apreciar la vacuna ARVAC en su versión Gamma presenta inmunogenicidad no sólo contra esa variante, sino también contra la variante Wuhan y la variante Ómicron de SARS-CoV-2.



## ESTUDIO CLÍNICO DE FASE 2/3

En base al perfil de seguridad hallado y a los resultados de inmunogenicidad, se seleccionó la dosis de 50 µg para el estudio clínico fase 2/3 dado que esta dosis evidenció un mayor incremento en la media geométrica de los títulos de anticuerpos neutralizantes manteniendo un muy buen perfil de seguridad. Además, la dosis de 50 µg permite el desarrollo de una vacuna bivalente con 25 µg de antígeno de cada variante. El desarrollo de una vacuna bivalente con antígenos de dos variantes se consideró importante por la posible aparición de nuevas variantes futuras en el momento de seleccionar la dosis. De hecho, ya en 2022 la variante prevalente era Ómicron BA.5. Ante esta situación epidemiológica, se orientó el desarrollo clínico a un estudio que incluyera tres versiones de ARVAC:

- una versión con antígeno basado en RBD de variante Gamma
- una versión con antígeno basado en RBD de variante Ómicron BA.4/5
- una versión con ambos antígenos antes mencionados.

Por otro lado, gracias a la campaña de vacunación en nuestro país la incidencia y prevalencia de COVID-19 disminuyeron significativamente. Ante esta situación se decidió subrogar la eficacia al aumento de título de anticuerpos neutralizantes, dado que ya aparecían correlaciones entre el nivel de protección de vacunas de diferentes plataformas con este parámetro de inmunogenicidad<sup>15,16,17,18</sup>.

Finalmente, si bien ARVAC podría ser una vacuna para primovacación se decidió que era más oportuno realizar un estudio clínico para registrarla como vacuna de refuerzo de otras vacunas contra COVID-19, dada la amplia cobertura de primovacación en nuestro país y en otros de la región latinoamericana.

En base a estos considerandos se diseñó un estudio de fase 2/3 aleatorizado, doble ciego, cruzado controlado contra placebo en voluntarios mayores de 18 años que tuvieran un esquema primario completo de vacunación y que hubieran recibido su última dosis vacunal al menos 4 meses antes. Es importante aclarar que en el protocolo originalmente aprobado por ANMAT los voluntarios debían tener no más de un refuerzo de vacuna contra COVID-19 recibido al menos 4 meses antes del ingreso al estudio, lo que se consideró importante para que se pudiera medir mejor el efecto inmunogénico de ARVAC ante la esperada disminución de la inmunogenicidad inducida con el esquema de vacunación primaria.

El estudio de fase 2/3 fue aprobado por ANMAT bajo la disposición autorizante Nro. DI-2023-181-APN-ANMAT#MS, el 09 de enero de 2023. El protocolo ha tenido 2 enmiendas\*<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>\* **Enmienda Nro. 1:** se aclararon los tiempos de análisis y reportes a realizar a lo largo del estudio en función de las etapas de reclutamiento y aclarar el momento de apertura del ciego del protocolo original para que los voluntarios conozcan qué tipo de vacuna recibieron.

**Enmienda Nro. 2:** se modificaron los criterios de elegibilidad respecto al esquema de vacunación previo recibido. La situación epidemiológica y la altísima proporción de la población (especialmente mayores de 60 años) ya vacunados contra el SARS-CoV-2 y con más de un refuerzo, se decidió incluir voluntarios previamente vacunados contra el virus SARS-CoV-2 con un esquema primario completo, pero con hasta 3 dosis de refuerzo posteriores, siempre y cuando la última dosis se hubiera recibido hasta 4 meses antes del ingreso al estudio. Asimismo, se modificó la población de inmunogenicidad incluyendo a aquellos voluntarios que hubieran recibido un esquema completo de vacunación contra el virus SARS-CoV-2 con hasta 2 refuerzos, habiendo recibido la última dosis 4 meses antes del ingreso al estudio en caso de un primer refuerzo o 9 meses antes, en caso de un segundo refuerzo. Esta consideración respecto a sólo 2 refuerzos



El reclutamiento se dividió en 2 etapas: la etapa 1 que incluyó 232 voluntarios que recibieron vacuna gamma y la etapa 2 que incluye un total de 1782 voluntarios más, quienes son asignados aleatoriamente a recibir vacuna gamma, ómicron o bivalente.

Las etapas del estudio se diseñaron del siguiente modo:

**Etapla 1:** 232 voluntarios de 18 a 60 años de edad, sanos, sin comorbilidades previas. Diseño cruzado en el que voluntarios fueron aleatorizados a uno de los siguientes grupos:

Grupo 1A (n = 116): 1 dosis de vacuna variante gamma + 1 dosis de placebo separadas por 28 días.

Grupo 1B (n = 116): 1 dosis de placebo + 1 dosis de vacuna variante gamma separadas por 28 días.

**Etapla 2:** 1782 individuos  $\geq 18$  años sin comorbilidades o con comorbilidades estables, aleatorizados a uno de los siguientes grupos:

Grupo 2A: 1 dosis de vacuna variante Gamma + 1 dosis de placebo separadas por 28 días formado por 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

Grupo 2B: que recibirán 1 dosis de placebo + 1 dosis de vacuna variante Gamma separadas por 28 días formado por 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

Grupo 3A: 1 dosis de vacuna variante Gamma/Ómicron + 1 dosis de placebo separadas por 28 días formados 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

Grupo 3B: 1 dosis de placebo + 1 dosis de vacuna variante Gamma/Ómicron separadas por 28 días formado por 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

Grupo 4A: 1 dosis de vacuna variante Ómicron + 1 dosis de placebo separadas por 28 días formado por 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

Grupo 4B: 1 dosis de placebo + 1 dosis de vacuna variante Ómicron separadas por 28 días formado por 2 subgrupos:

1. sujetos entre 18 y 60 años (n=184)
2. sujetos mayores de 60 años (n=113)

---

permitidos en la población de inmunogenicidad se basó en la intención de mantener un contexto similar al utilizado en la evaluación de otras vacunas de refuerzo ya aprobadas y ya aplicándose en el resto del mundo<sup>19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27</sup>. La selección de 9 meses como tiempo desde la última dosis aplicada se basa en que la efectividad de las vacunas utilizadas como refuerzo se ve disminuida sustancialmente luego de este período<sup>28</sup>.



Los voluntarios que recibieron al menos una dosis de vacuna o placebo fueron:

- Para la evaluación de seguridad 1961 voluntarios recibieron vacuna y 1957 recibieron placebo.
- Para la evaluación de inmunogenicidad se evaluaron 1064 voluntarios.

Los objetivos primarios del estudio están vinculados a las siguientes variables de inmunogenicidad:

Etapas 1, comparación de la tasa de seroconversión obtenida con el candidato vacunal con la tasa obtenida con el placebo y con una tasa de referencia de 75%.

Etapas 2, comparación de la tasa de seroconversión obtenida con cada candidato vacunal con el placebo y con una tasa de referencia de 75% para cada uno de los dos grupos etarios (entre 18 y 60 años y mayores de 60 años)

Seroconversión se define a los 14 días de la aplicación del candidato vacunal o de su placebo comparador, cuando se cumple con alguno de los siguientes criterios:

- que el título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 contenidas en el candidato vacunal sea al menos 4 veces mayor respecto del basal.
- que el título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal sea al menos 2 veces superior respecto del título basal, siempre que dicho título basal frente a la variante Wuhan sea igual o mayor a 949 unidades internacionales/ml. (Aclaración: este valor de 949 UI/ml corresponde a la dilución 1/256 que es la que más se acerca al valor de 1030 UI/ml correlacionado con 90 % de protección contra COVID-19 en la literatura<sup>15</sup>. Dado que en la literatura el valor de 120 UI/ml ya ofrece un 80% de protección y 1030 UI/mL una protección del 90 %, el valor de 949 UI/mL corresponde a personas con una protección ya muy cercana al 90% antes de la vacunación).

Los objetivos secundarios del estudio están vinculados a otras medidas de inmunogenicidad como la tasa de seroconversión frente a las otras variantes para cada versión vacunal de ARVAC (Gamma, Ómicron y Bivalente) y el incremento del título de anticuerpos neutralizantes y su media geométrica, así como a las siguientes variables de seguridad evaluadas luego de cada aplicación de vacuna o placebo:

- Reacciones locales durante los 7 días posteriores a la aplicación.
- Reacciones sistémicas durante los 7 días posteriores a la aplicación.
- Eventos adversos (EA) hasta 1 mes después de la última aplicación.
- Eventos adversos serios (EAS) hasta los 3 meses después de la última aplicación.
- Alteraciones en los laboratorios respecto del control basal, a los 30 días de cada aplicación.

El tamaño muestral para los objetivos primarios de inmunogenicidad fue estimado en:

- 17 participantes tratados con vacuna y 17 tratados con placebo para probar la hipótesis de superioridad de la tasa de seroconversión luego de 14 días de vacuna frente a placebo con un error alfa de 0,05 y una potencia del 80 % si la vacuna tiene una tasa similar al 85 % y el placebo al 40 % estimando un dropout del 10 %
- 113 participantes tratados con vacuna para probar la hipótesis de que el límite inferior del intervalo de confianza de la tasa de seroconversión con vacuna es mayor o igual al 75% con un error alfa de 0,05 y una potencia del 80%, si la vacuna tiene una tasa del 85% estimando una pérdida (*dropout*) del 10%. Sin *dropout* alcanzaría con 101 participantes.

El tamaño muestral para el objetivo de seguridad se fijó en base a estos criterios:



- Alcanzar una precisión en las frecuencias de efectos secundarios de 3% para lo cual se requiere una muestra de 1335 participantes que reciban vacuna.
- Detectar al menos 1 efecto adverso si la frecuencia es de 1/1000, usando una distribución de Poisson, con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,20 (potencia 80%). Para esto se estima 1610 participantes y 2013 estimando un dropout de 20 %.
- La población de seguridad es una sola independiente de la versión de ARVAC empleada en el estudio dado que se trata de la misma vacuna (misma composición de excipientes y concentración de antígeno) conteniendo antígenos molecularmente casi idénticos salvo por algunos aminoácidos.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas, en varios sitios de investigación en distintas provincias del país. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

El primer participante se incorporó el 6 de febrero de 2023.

Cabe aclarar aquí que en ninguno de los estudios clínicos se administraron otras vacunas en forma concomitante con ARVAC.

En la etapa 1 del estudio de fase 2/3 sólo se empleó ARVAC versión Gamma conteniendo 50 µg de antígeno RBD dímero variante Gamma. En la **Tabla 2** se resumen los resultados de la inmunidad generada por ARVAC en su versión Gamma luego de 14 días de vacunación contra las tres variantes de SARS-CoV-2 estudiadas en la etapa 1 del estudio de fase 2/3.

**Tabla 2.12: Inmunogenicidad de ARVAC versión Gamma luego de 14 días de vacunación en etapas 1 del estudio de fase 2/3**

Parámetro de inmunogenicidad	Variantes		
	Wuhan	Gamma	Ómicron BA.5
<b>Etapa 1 (n = 114)</b>			
Tasa de Seroconversión (%) (IC 95%)	87,7 (80,4 – 92,5)	90,4 (83,5 – 94,5)	84,2 (76,4 – 89,8)
GMR	9,6	12,7	9,8

GMR = cociente entre la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes luego de 14 días de vacunación y antes de vacunar.

% seroconversión = porcentaje de participantes que al menos multiplicó su título de anticuerpos neutralizantes 4 veces respecto del valor basal.

Al completar la etapa 1 del estudio de fase 2/3 se llegó a tener el tamaño muestral suficiente para aseverar que la tasa de seroconversión supera el 75 % con una potencia estadística del 80% y un error alfa de 0,05 ya



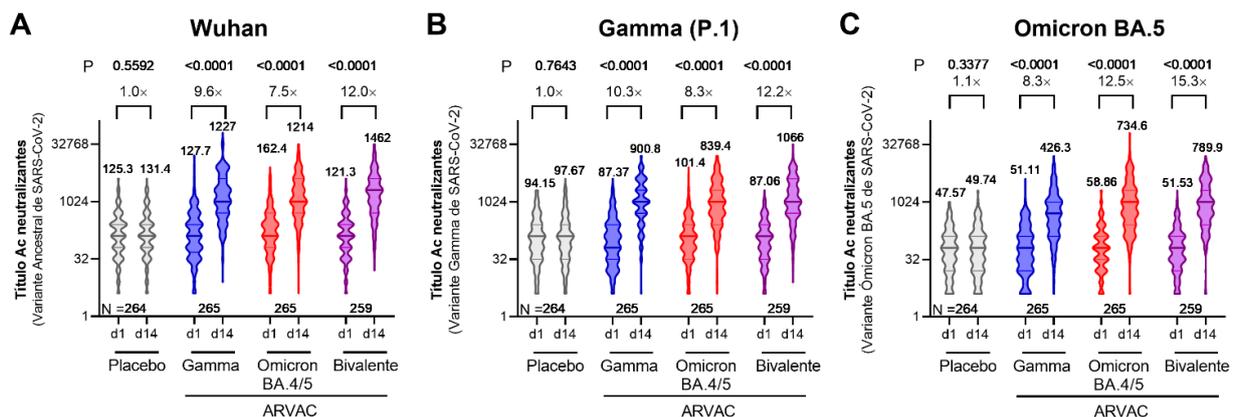
que se superó el tamaño estimado de 101 participantes (n=114) y se cumplieron los supuestos de la estimación original.

En cuanto a la inmunogenicidad de ARVAC versión Gamma contra Ómicron hallada en el estudio de fase 2/3, si bien hubo un contexto epidemiológico con circulación de Ómicron BA.5 durante este estudio que podría influir en la respuesta inmune, existen otros estudios y observaciones que explican por qué la vacunación con ARVAC versión gamma induce una respuesta inmune contra Ómicron BA.5.

- Se ha descrito previamente que antígenos adaptados a variantes del SARS-CoV-2 pueden ser más inmunogénicos que el antígeno basado en el virus ancestral. Por ejemplo, la proteína spike de la variante beta, cuyo dominio RBD difiere en un solo aminoácido con la variante gamma, expone los epítopes de manera que son mejor reconocidos por el sistema inmune<sup>11</sup>.
- En coincidencia, se ha reportado que la capacidad de neutralización cruzada cuando se utilizan sueros de personas infectadas con la variante del virus beta es mayor que la de sueros de aquellos que se infectaron con la variante Wuhan.
- En línea con estos trabajos, estudios de inmunogenicidad en animales han demostrado que la primo vacunación con la fórmula ARVAC conteniendo el antígeno RBD gamma induce una respuesta inmunogénica más amplia que la versión ancestral<sup>23</sup>. Además, la amplitud de los anticuerpos neutralizantes inducido por ARVAC versión Gamma también fue demostrado en el estudio fase 1 previo en 80 voluntarios, donde la vacunación con ARVAC versión Gamma aumentó los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la variante Wuhan, la variante Gamma y las variantes Delta, Ómicron BA.1 y Ómicron BA.5<sup>14</sup>.
- El incremento observado en la fase 1 en la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra ómicron BA1 y BA5 fue independiente de la infección previa por COVID ya que se analizaron los datos en individuos con o sin infección previa y no se observaron diferencias<sup>14</sup>.
- Otro factor que podría explicar la generación de una respuesta inmune amplia es el hecho de que es un refuerzo con una variante distinta a la del esquema primario (primado con Wuhan y refuerzo con Gamma). Esto se ha observado en estudios realizados en primates no humanos<sup>29</sup>.

En cuanto a la etapa 2, en la figura 2 se resumen los resultados obtenidos para la multiplicación del título de anticuerpos neutralizantes entre los 14 días luego de aplicada ARVAC en sus tres versiones y el correspondiente título basal.

**Figura 2.12- Incremento del título de anticuerpos neutralizantes luego de 14 días de aplicada la vacuna respecto del título basal en todos los participantes de la etapa 2 del estudio de fase 2/3**





Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a las variantes Wuhan **(A)**, Gamma **(B)** y Ómicron BA.5 **(C)** en muestras de plasma obtenidas antes (d1) o a los 14 días (d14) luego de la aplicación de Placebo (N=264) o alguna de las tres variantes de vacuna estudiadas: ARVAC Gamma (N=265), ARVAC Ómicron BA.4/5 (N=265) o ARVAC Bivalente (N=259)). Las medias geométricas de los títulos se encuentran encima de los gráficos tipo violín. El aumento en veces en la media geométrica de los títulos se encuentra sobre una línea que conecta ambos tiempos seguido del símbolo x. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico de dos colas pareado de Wilcoxon. El dato de P se encuentra en el gráfico.

En la tabla 3 se listan las tasas de seroconversión halladas en todos los participantes de la etapa 2 del estudio de fase 2/3 con datos de inmunidad humoral.

**Tabla 3.12: Resultados Etapa 2. Tasas de seroconversión en los participantes evaluados luego de la administración de la vacuna o placebo**

Tratamiento	Versión	ARS-CoV-2	%*	IC95%		Fisher vs. Placebo	75% z-test (P)
				Inf	Sup		
Placebo	N=264	Wuhan	2,5	1,0	7,0		
		Gamma	2,1	1,7	6,6		
		Ómicron BA.5	5,2	1,3	10,0		
ARVAC	Gamma N=265	Wuhan	6,8	2,2	10,3	<0,0001	=0,000009
		Gamma	4,2	1,9	8,1	<0,0001	=0,0006
		Ómicron BA.5	1,9	1,6	6,1	<0,0001	=0,010
	Ómicron BA.4/5 N=265	Wuhan	10,0	4,8	14,4	<0,0001	=0,06
		Gamma	2,3	1,7	6,4	<0,0001	=0,006
		Ómicron BA.5	7,5	3,0	11,0	<0,0001	=0,000002
	Bivalente N=259	Wuhan	2,7	1,8	5,3	<0,0001	=0,0000000005
		Gamma	1,1	1,0	4,0	<0,0001	=0,000000002
		Ómicron BA.5	2,7	1,8	5,3	<0,0001	=0,0000000005

Seroconversión a los 14 días de la administración del producto en investigación o placebo, definida por alguno de los 2 criterios siguientes: a) título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 4 veces mayor respecto del basal; o b) título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 2 veces superior respecto del título basal, siempre que los niveles de anticuerpos basales frente a la variante Wuhan sean mayores a 949 UI/ml.

Como se puede apreciar la vacuna ARVAC en su versión bivalente tiene tasas de seroconversión promedio de más del 90 % contra todas las variantes ensayadas (Wuhan, Gamma y Ómicron BA.5). En todos los casos la tasa de seroconversión de ARVAC bivalente supera ampliamente la del placebo y el límite inferior del intervalo de confianza de ARVAC en su versión bivalente supera ampliamente el 75 %. También ARVAC en su versión



Ómicron BA.4/5 tiene tasas de seroconversión promedio respecto de Ómicron BA.5 de 87,3 % con un límite inferior del intervalo de confianza muy superior a 75 % de seroconversión. Además del cálculo de seroconversión utilizando los títulos de anticuerpos como se estableció en el protocolo, se decidió realizar otro análisis de seroconversión utilizando títulos normalizados respecto a un estándar secundario que se agrega en cada placa del ensayo. Las tasas de seroconversión determinadas luego de normalizar los títulos de todos los voluntarios de Etapa 2 se detallan en la **Tabla 4.12**

**Tabla 4.12: Resultados de la Etapa 2. Tasas de seroconversión utilizando títulos de anticuerpos normalizados evaluados luego de la administración de la vacuna o placebo**

Tratamiento	Versión N	SARS-CoV-2	%*	IC95%		Fisher vs. Placebo	>75% (z-test) (P)
				LI	LS		
Placebo	N=264	Wuhan	<b>12,5</b>	9,0	17,0		
		Gamma	<b>12,1</b>	8,7	16,6		
		Ómicron BA.5	<b>15,2</b>	11,3	20,0		
ARVAC	Gamma N=265	Wuhan	<b>86,8</b>	82,2	90,3	P<0,0001	P=0,000009
		Gamma	<b>84,2</b>	79,3	88,1	P<0,0001	P=0,0006
		Ómicron BA.5	<b>81,9</b>	76,8	86,1	P<0,0001	P=0,010
	Ómicron BA.4/5 N=265	Wuhan	<b>80,0</b>	74,8	84,4	P<0,0001	P=0,06
		Gamma	<b>82,3</b>	77,2	86,4	P<0,0001	P=0,006
		Ómicron BA.5	<b>87,5</b>	83,0	91,0	P<0,0001	P=0,000002
	Bivalente N=259	Wuhan	<b>92,3</b>	88,4	94,9	P<0,0001	P=0,0000000001
		Gamma	<b>91,1</b>	87,0	94,0	P<0,0001	P=0,000000002
		Ómicron BA.5	<b>92,7</b>	88,8	95,3	P<0,0001	P=0,00000000005

Seroconversión a los 14 días de la administración del producto en investigación o placebo utilizando títulos normalizados, definida por alguno de los 2 criterios siguientes: a) título normalizados de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 4 veces mayor respecto del basal; o b) título de anticuerpos neutralizantes normalizados contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 4 veces superior respecto del título basal, siempre que los niveles de anticuerpos basales frente a la variante Wuhan sean mayores a 949 UI/ml.

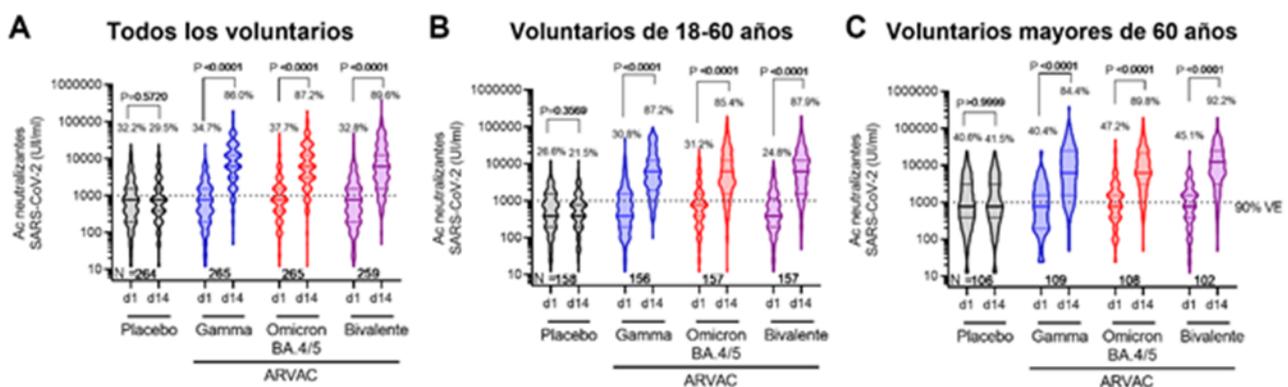


Como se puede apreciar en la tabla 4.12, las tasas de seroconversión calculadas en base a los títulos normalizados de anticuerpos neutralizantes fueron muy similares a las descritas más arriba con análogas conclusiones respecto del desempeño de ARVAC en su versión bivalente y ARVAC

Ómicron BA.4/5 y permiten sacar las mismas conclusiones ya resumidas: ARVAC en su versión bivalente y Ómicron BA.4/5 demuestran ser eficaces en personas mayores de 18 años con o sin comorbilidades contra las variantes homólogas de cada una de estas vacunas.

Dado que se empleó un estándar secundario se pudo medir el título de anticuerpos en unidades internacionales por mL (UI/mL) valorado para la variante Wuhan. Si bien todavía no se ha determinado el correlato de protección para las vacunas contra el SARS-CoV-2 hay varios trabajos que correlacionan los niveles de anticuerpos neutralizantes en sangre con la eficacia de las vacunas<sup>15, 16, 17, 18</sup>. Por ej. en el trabajo de Shuo Feng et. al.<sup>15</sup> estiman que niveles de anticuerpos neutralizantes de 120 UI/ml correlacionan con un 80% de eficacia de la vacuna (VE) contra la infección sintomática, mientras que niveles de 1030 UI/ml con un 90%. En la **Figura 3.12** se incluyeron estos valores en líneas punteadas horizontales para todos las versiones de ARVAC:

**Figura 3.12- Porcentaje de individuos que alcanzó títulos de anticuerpos neutralizantes  $\geq 1030$  UI/mL luego de 14 días de aplicado placebo o vacuna ARVAC en etapa 2 del estudio de fase 2/3**



Niveles de anticuerpos neutralizantes expresados en UI/ml. El ensayo de seroneutralización realizado está estandarizado con el standard internacional de la OMS (NIBSC código: 20/268). Los gráficos muestran los títulos neutralizantes de la variante Wuhan o Ancestral expresados en UI/ml correspondientes a los voluntarios vacunados con Placebo o ARVAC (versión Gamma, Ómicron BA.5 o Bivalente) antes (1d) o luego de 14 la primera dosis (14d). La línea punteada horizontal muestra los valores en UI/ml propuestos como correlato de 90% de protección de la infección sintomática (1030 UI/ml). Encima de cada grupo se encuentra el porcentaje de voluntarios con niveles de anticuerpos por encima del valor especificado. Las diferencias entre proporciones se evaluaron mediante el test Chi-cuadrado. ns:  $P > 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,0001$

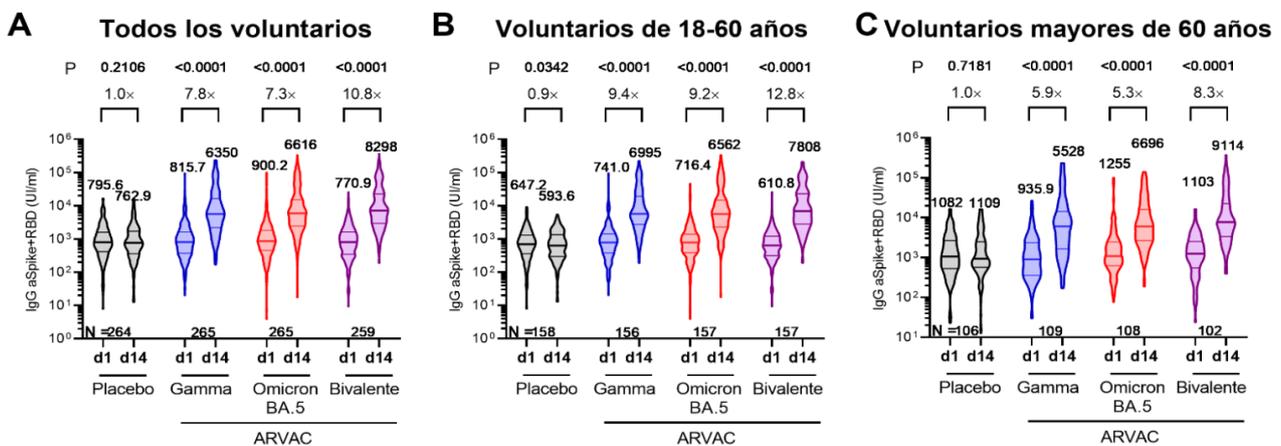
Como se puede apreciar, el porcentaje de individuos con niveles de anticuerpos mayores a 1030 UI/ml - que correlaciona con 90% de protección contra COVID-19 sintomático<sup>15</sup> - en los grupos etarios de 18 a 60 años y mayores de 60 años a los 14 días de aplicarse la vacuna ARVAC en todas sus versiones de los individuos alcanzó o superó el 85,4 %. Este puente entre inmunogenicidad y protección permite inferir que ARVAC en todas sus versiones protege eficazmente contra COVID-19 a ambos grupos etarios.



Además, se exploraron otras dos variables de inmunogenicidad de ARVAC en sus tres versiones: título de anticuerpos anti – Spike y título de anticuerpos neutralizantes en mucosas.

En cuanto al título de anticuerpos IgG anti-Spike, en la figura 4 se muestran los niveles de anticuerpos IgG anti-Spike hallados en las muestras de 781 voluntarios de etapa 2 del estudio de fase 2/3 en muestras de plasma obtenidas antes y 14 días después de recibir el candidato vacunal ARVAC (N=264 Gamma, N=264 Ómicron BA.5 y N=258 Bivalente) o el placebo (N=261). Se observó un aumento significativo de los niveles de IgG anti-Spike (d1 vs. d14,  $P < 0,0001$ ) en los voluntarios que recibieron la vacuna ARVAC versión Gamma, Ómicron BA.5 o Bivalente respectivamente. Dicho aumento no se evidenció en los individuos que recibieron placebo (d1 vs. d14,  $P > 0,05$ ).

**Figura 4.12- Títulos de anticuerpos IgG anti-Spike en plasma antes y a los 14 días de aplicado placebo o ARVAC en sus diferentes versiones**



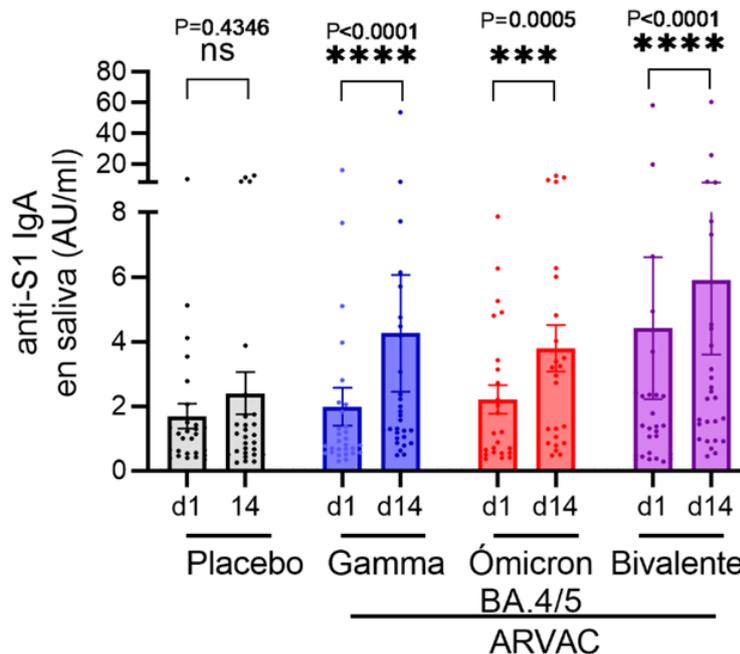
Niveles de anticuerpos IgG anti-Spike antes (d1) o a los 14 días (d14) de la aplicación de Placebo o alguna de las versiones de ARVAC estudiadas: ARVAC Gamma, Ómicron BA.5 o Bivalente) en (A) todos los voluntarios de etapa 2 analizados, (B) los voluntarios con edad entre 18-60 años o (C) los voluntarios mayores de 60 años. Las medias geométricas de los niveles de IgG anti-Spike se encuentran encima de los <gráficos tipo violín. El aumento en veces en la media geométrica se encuentra sobre una línea que conecta ambos tiempos seguido del símbolo x. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico pareado de Wilcoxon. El dato de P se encuentra en el gráfico.

En cuanto a los anticuerpos en mucosas, de una subpoblación de individuos de cada rama de la etapa 2 del estudio de fase 2/3 se obtuvieron muestras de saliva y se analizaron los niveles de IgA anti-S1 (subunidad de Spike que contiene el antígeno vacunal RBD) antes y después del tratamiento recibido, como una aproximación para determinar la inducción de respuestas en las mucosas.

Los resultados indican que en los voluntarios que recibieron alguna de las vacunas ARVAC (Gamma, Ómicron o Bivalente) hubo un aumento significativo de IgA antígeno específico en saliva ( $P < 0,001$  d1 vs. d14), este aumento no se evidenció en los voluntarios que recibieron Placebo ( $P > 0,05$  d1 vs. d14) (**Figura 5.12**).



**Figura 5.12- Títulos de anticuerpos IgA anti-S1 (subunidad de la proteína Spike) en saliva antes y a los 14 días de aplicado placebo o ARVAC en sus diferentes versiones**



Niveles de anticuerpos IgA anti-S1 en saliva en unidades arbitrarias/ml (UA/ml) antes (d1) o a los 14 días (d14) de la aplicación de Placebo (N=28) o alguna de las versiones de ARVAC estudiadas: ARVAC Gamma (N=29), Ómicron BA.4/5 (N=24) o Bivalente (N=27)) en 108 voluntarios de etapa 2 analizados. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico pareado de Wilcoxon. \*\*\*: P<0,001; \*\*\*\*: P<0,0001; ns: P>0,05.

Podemos resumir los resultados de inmunogenicidad diciendo que ARVAC en su versión bivalente y Ómicron son eficaces en personas de 18 años y mayores con y sin comorbilidades en base a los resultados con las variantes homólogas y al porcentaje de personas de más del 85 % que alcanzó títulos de anticuerpos neutralizantes correlacionados con una protección del 90 %. Asimismo, se ha determinado aumento significativo del título de anticuerpos neutralizantes IgG anti-Spike en plasma y aumento de IgA anti-S1 (subunidad de Spike) en saliva (mucosas).



En cuanto a los resultados de seguridad, 1961 recibieron al menos una dosis del tratamiento (vacuna o placebo). Los efectos adversos locales reportados se resumen en la **Tabla .12**.

**Tabla 5.12- Efectos adversos locales luego de recibir dosis de vacuna o placebo**

Total		Vacuna (n=1961)				Placebo (n=1957)				Valor de p (**)
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (*)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (*)	
Dolor espontáneo	n	810	31	0	841	601	11	1	613	<0,001
	%#	96,3	3,7	0,0	42,9	98,0	1,8	0,2	31,3	
Sensibilidad/Molestia	n	565	69	4	638	385	30	2	417	<0,001
	%#	88,6	10,8	0,6	32,5	92,1	7,2	0,5	21,3	
Eritema/enrojecimiento	n	74	3	0	77	44	1	0	45	NS (0,660)
	%#	96,1	3,9	0,0	3,9	97,8	2,2	0,0	2,3	
Hinchazón/Induración	n	155	3	0	158	73	0	0	73	NS (0,257)
	%#	98,1	1,9	0,0	8,1	100,0	0,0	0,0	3,7	
Prurito/Picazón	n	54	0	0	54	28	1	0	29	NS (0,987)
	%#	100,0	0,0	0,0	2,8	96,6	3,4	0,0	1,5	

Los datos se presentan como número de sujetos por grupo de voluntarios en función del producto de investigación recibido (vacuna o placebo), y en función de la severidad del evento reportado. Se incluyen todas las dosis administradas de vacuna y de placebo. (\*) Porcentaje en función del total de voluntarios por grupo de tratamiento. (#) Porcentaje en función del número total del evento reportado. (\*\*) Prueba de chi cuadrado. La clasificación de toxicidad se ha realizado de acuerdo con las Guías para la Industria – Escalas de Graduación de Toxicidad para Voluntarios Sanos Adultos Mayores y Adolescentes Enrolados en Ensayos Clínicos de Vacunas Profilácticas (CBER – FDA, 2007).



Los efectos adversos sistémicos solicitados reportados se resumen en la **Tabla 6.12**

**Tabla 6.12: Eventos adversos sistémicos solicitados reportados en el estudio de fase 2/3**

Evento		Vacuna (n=1961)					Placebo (n=1957)				Valor de p (**)
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Total (*)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (*)	
Diarrea	n	43	3	1		47	38	1		39	NS (0,388)
	%#	91,5	6,4	2,1		2,4	97,4	2,6		2,0	
Dolor de cabeza/Cefalea	N	203	37	2		242	170	17	1	188	0,006
	%#	83,9	15,3	0,8		12,3	90,4	9,0	0,5	9,6	
Dolores articulares	N	48	7	1		56	39	7		46	NS (0,321)
	%#	85,7	12,5	1,8		2,9	84,8	15,2		2,4	
Dolores musculares/Mialgias	N	103	15	1		119	93	14		107	NS (0,420)
	%#	86,6	12,6	0,8		6,1	86,9	13,1		5,5	
Escalofríos	N	34	7	1		42	26	3		29	NS (0,122)
	%#	81,0	16,7	2,4		2,1	89,7	10,3		1,5	
Fatiga/Cansancio/Decaimiento	N	206	23	2	1	232	169	19		188	0,024
	%#	88,8	9,9	0,9	0,4	11,8	89,9	10,1		9,6	
Fiebre	N	22	6	1		29	14	1		15	0,034
	%#	75,9	20,7	3,4		1,5	93,3	6,7		0,8	
Náuseas	N	32	2			34	31	3		34	NS (0,993)
	%#	94,1	5,9			1,7	91,2	8,8		1,7	
Palpitaciones	N	15	3			18	12	1		13	NS (0,370)
	%#	83,3	16,7			0,9	92,3	7,7		0,7	
Somnolencia	N	196	24	2		222	183	16		199	NS (0,243)
	%#	88,3	10,8	0,9		11,3	92,0	8,0		10,2	
Vómitos	N	6				6	3	3		6	NS (0,997)
	%#	100,0				0,3	50,0	50,0		0,3	

Los datos se presentan como número de sujetos por grupo de voluntarios en función de la variante de la vacuna recibida, y en función de la severidad del evento reportado. (\*) Porcentaje en las columnas coloreadas indica la incidencia de los eventos en función del total de las dosis aplicadas. (#) Los porcentajes presentados en las filas debajo de cada valor absoluto, representa la incidencia de los eventos en función de su severidad, en relación con el total de casos de ese evento. (\*\*) Prueba de chi cuadrado. La clasificación de toxicidad se ha realizado de acuerdo con las Guías para la Industria – Escalas de Graduación de Toxicidad para Voluntarios Sanos Adultos Mayores y Adolescentes Enrolados en Ensayos Clínicos de Vacunas Profilácticas (CBER – FDA, 2007).

Además, se reportaron los eventos adversos no solicitados reportados como posible, probable o definitivamente asociados a la vacunación que se resumen en la **Tabla 7.12** clasificados por órgano y sistema.



**Tabla 7.12: Eventos adversos no solicitados reportados en el estudio de fase 2/3**

Clasificación por órgano y sistema	Eventos adversos	ARVAC (n = 1961)	Placebo (n = 1957)	Valor de p (*)
Exploraciones complementarias	Aumento de leucocitos	4	1	NS (0,318)
	Aumento del recuento plaquetario	1	—	
	Aumento de eosinófilos	—	1	
	Aumento de enzimas hepáticas	—	1	
	TGO elevada	3	3	
	TGP elevada	1	3	
	LDH elevada	3	1	
	PCR elevada	1	—	
	Alteración análisis de orina	1	—	
	Aumento de bilirrubina total	1	—	
Infecciones e infestaciones	Faringoamigdalitis bacteriana	—	1	NS (0,317)
Trastornos cardíacos	Palpitaciones	—	2	NS (0,157)
Trastornos del oído y del laberinto	Dolor en oído derecho	1	—	NS (0,999)
	Otalgia	—	1	
Trastornos del sistema nervioso	Hormigueo en el brazo	1	—	NS (0,108)
	Insomnio	4	—	
	Mareos	4	4	
	Disestesia en miembro inferior izquierdo	1	—	
	Parestesias	2	2	
Trastornos gastrointestinales	Temblor en pierna izquierda	1	—	NS (0,298)
	Malestar estomacal	1	—	
	Dolor abdominal	3	2	
	Dolor de garganta / odinofagia	8	7	
	Gusto raro al tragar	1	—	
Síndrome gastrointestinal	1	—		
	Hematoma en el sitio de aplicación	6	—	<b>0,002</b>



Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración	Sed	1	—	
	Sequedad de garganta	1	—	
	Síndrome gripal	6	—	
	Síndrome pseudogripal	1	1	
	Sudoración	2	1	
	Calor corporal	1	—	
	Malestar en el cuello	—	1	
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	Dolor en el brazo	2	1	NS (0,318)
	Artralgia y artritis rodilla derecha	1	—	
	Dolor lumbar, lumbalgia, dolor de espalda	2	2	
	Dolor en articulación del codo	1	—	
Trastornos oculares	Sensibilidad a la luz	2	—	NS (0,565)
	Cansancio en la vista	—	1	
Trastornos renales y urinarios	Proteinuria	—	1	NS (0,317)
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos	Rinitis, Rinorrea	5	4	NS (0,276)
	Tos			
	Falta de aire		—	
	Congestión nasal			
	Sensibilidad nasal		—	
	Broncoespasmo	—		

Clasificación por órgano y sistema	Eventos adversos	ARVAC (n = 1961)	Placebo (n = 1957)	Valor de p (*)
Trastornos de la piel y del tejido celular subcutáneo	Rash cutáneo en el sitio de inyección	1	—	NS (0,562)
	Rash vesicular en rostro	—	1	
	Sarpullido en codos	—	1	
Trastornos vasculares	Epistaxis	1	—	NS (0,218)



Trastornos del aparato reproductor y de la mama	Alteración del ciclo menstrual	2	—	NS (0,158)
Trastornos de la sangre y del sistema linfático	Adenopatía axilar		—	NS (0,656)
	Hematocrito disminuido		—	
	Empeoramiento de la anemia		—	
	Inflamación zona axilar		—	

En la **Tabla 7.12** ( se presenta la frecuencia y el porcentaje de la incidencia de eventos adversos considerados relacionados (definitiva, probable o posiblemente relacionados) con la aplicación del producto en estudio (vacuna o placebo), clasificados por órgano y sistema. Se presenta la incidencia estimada en función de la cantidad de dosis totales aplicadas de cada variante de vacuna, y comparativamente entre vacuna y placebo. Los trastornos generales fueron significativamente más frecuentes con la vacuna, aunque en todos los casos la incidencia fue menor al 1%.

(\*) Prueba de chi cuadrado.

No se ha reportado ningún evento adverso serio relacionado con la vacuna o el placebo. Asimismo, no se observaron variaciones de laboratorio clínica o médicamente significativas.

Esto permite concluir que se trata de una vacuna segura en base a los datos ya analizados.

Por lo tanto, consideramos que todas las versiones de ARVAC son seguras para la población de adultos de 18 años en adelante con y sin comorbilidades que han recibido un esquema completo de vacunación primaria contra el SARS-CoV-2.

## VISIÓN GENERAL DE EFICACIA

Dada la situación de amplia cobertura de vacunación y la baja incidencia de COVID-19 en nuestro país, la eficacia ha sido subrogada por la medición de inmunogenicidad en los estudios clínicos realizados con ARVAC. La vacunación con ARVAC induce un título de 1030 UI/ml (correlacionado en la literatura<sup>15</sup> con un 90% de protección contra COVID-19 sintomático) en más del 85 % de los participantes de los estudios clínicos. Este efecto se debe a la administración de ARVAC, ya que el nivel de anticuerpos neutralizantes no se incrementa a los 14 días de recibir una dosis de placebo.

Estos resultados se exponen gráficamente en la figura 4 y permiten concluir que ARVAC tiene una elevada eficacia como vacuna de refuerzo.

## VISIÓN GENERAL DE SEGURIDAD

Los efectos adversos locales y sistémicos reportados son en general los comúnmente observados en otras vacunas similares.

No se observaron efectos adversos serios relacionados con la vacuna, ni modificaciones de análisis de laboratorio de relevancia clínica.

Esto permite concluir que ARVAC es una vacuna segura en base a los datos de los estudios clínicos analizados.



## CONCLUSIONES:

- ARVAC indujo un aumento significativo de anticuerpos neutralizantes, mientras que en la población que recibió placebo este aumento no se observó.
- ARVAC es una vacuna de refuerzo contra COVID-19 con seroconversión promedio de más del 85 % a los 14 días de la vacunación que permite alcanzar títulos de anticuerpos de más de 1030 UI/ml (correlacionados con un 90 % de protección contra enfermedad sintomática) en más del 85 % de los participantes mayores de 18 años con y sin comorbilidades.
- En relación con la seguridad, ARVAC no presentó eventos adversos serios, ni modificaciones de laboratorio de relevancia clínica y sus efectos adversos locales y sistémicos son los esperados para una vacuna. Se debe tener en cuenta que el diseño de ARVAC es similar a otras vacunas que se han usado ampliamente como la vacuna contra la Hepatitis B o la vacuna contra HPV.



## 13. INFORMACIÓN PARA PRESCRIBIR:

### ARVAC

#### VACUNA CONTRA COVID-19 DE SUBUNIDAD PROTEICA RBD

Gamma 25 mcg/Ómicron BA.4/5 25 mcg por dosis

Suspensión inyectable de administración intramuscular

Venta bajo receta

### FÓRMULA

Cada frasco ampolla multidosis contiene 10 dosis de 0,5 ml de la siguiente composición para administración intramuscular simultánea:

Antígeno de superficie recombinante del virus SARS-CoV-2 (dominio de unión al receptor de la proteína de superficie espiga variante Gamma)	25 µg
Antígeno de superficie recombinante del virus SARS-CoV-2 (dominio de unión al receptor de la proteína de superficie espiga variante Ómicron BA.4/5)	25 µg
Gel de hidróxido de aluminio (*)	0,5 mg de aluminio
Fosfato monosódico anhidro	0,090 mg
Fosfato disódico anhidro	0,071 mg
Cloruro de sodio	0,730 mg
L-Histidina	0,582 mg
Manitol	20,05 mg
Agua para inyectables c.s.p.	0,5 ml

(\*) Se ajusta la cantidad de gel de hidróxido de aluminio para obtener una concentración de aluminio de 0,5 mg por dosis de 0,5 ml.

Cada ampolla y frasco-ampolla monodosis contiene una dosis de 0,5 ml de la misma composición declarada en la tabla anterior.

Esta vacuna no contiene el virus y no puede provocar la enfermedad de COVID-19.

### ACCIÓN TERAPÉUTICA

ARVAC Vacuna contra COVID-19 de subunidad proteica RBD refuerza la respuesta inmune específica contra SARS-CoV-2 en personas de 18 años y mayores, previamente vacunadas contra este virus para prevenir la enfermedad COVID-19. Código ATC: J07B



## INDICACIONES

ARVAC es una vacuna de subunidad proteica recombinante de administración intramuscular para la indicación de refuerzo de esquemas de vacunación contra COVID-19 en personas de 18 años de edad y mayores que ya han recibido un esquema completo de vacunación primaria contra esta enfermedad.

## CARÁCTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS

La vacuna ARVAC contra COVID-19 de subunidad proteica RBD contiene dos antígenos proteicos que incluyen la parte de la proteína espiga del virus SARS-CoV-2 denominada RBD (Dominio de Unión al Receptor) de las variantes Gamma y Ómicron. Estos antígenos se producen por medio de tecnología de ADN recombinante usando un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) en las que se ha incorporado el gen que codifica el antígeno, que luego se aísla y purifica.

### Mecanismo de acción

Esta parte de la proteína espiga se une a un receptor en las células humanas y le permite al virus ingresar en ellas y replicarse provocando la enfermedad infecciosa COVID-19. Al exponer al organismo humano a esta proteína mediante la aplicación de esta vacuna, el sistema inmune refuerza la inmunidad específica contra el virus SARS-CoV-2 obtenida por una vacunación previa. El mecanismo de acción consiste en bloquear la capacidad de unión de la porción RBD de la proteína espiga al receptor que utiliza el virus para ingresar a la célula, lo cual imposibilita la replicación viral. En la vacuna los antígenos están adsorbidos sobre hidróxido de aluminio como adyuvante, para intensificar su acción inmunogénica.

## ESTUDIOS CLÍNICOS

El desarrollo clínico de ARVAC consistió en dos estudios clínicos: un estudio de fase 1 y un estudio de fase 2/3. El estudio de fase 1 fue diseñado como un estudio abierto, prospectivo en voluntarios sanos de 18 a 55 años, previamente vacunados con un esquema primario completo contra el virus SARS-CoV-2, con la última dosis aplicada al menos 4 meses antes del ingreso al estudio. Los participantes recibieron dos aplicaciones de ARVAC con dos concentraciones diferentes de antígeno basado en RBD de la variante Gamma: 25 µg y 50 µg. Se asignaron 60 voluntarios para recibir dos aplicaciones con 25 µg de antígeno cada una y 20 para recibir dos aplicaciones con 50 µg

de antígeno cada una. El objetivo primario de este estudio fue la seguridad. Durante el desarrollo del estudio, no se han reportado eventos adversos serios asociados a la vacuna en estudio. Los eventos adversos reportados fueron clasificados de la siguiente manera:

### - Reacciones locales:

- muy frecuentes (más de 1/10): molestias/sensibilidad y dolor en el sitio de inyección.
- frecuentes (entre 1/100 y 1/10): hinchazón/induración, eritema/enrojecimiento y prurito.

### - Reacciones adversas sistémicas:

- muy frecuentes (más de 1/10): somnolencia, dolor de cabeza, fatiga/cansancio y mialgias.

Todos los eventos reportados fueron de intensidad leve o moderada. No se reportaron eventos de intensidad de grado 3 o superior. Sólo se reportó un caso de fiebre de 24 h de duración.

- Con relación a los controles de laboratorio, no se detectaron variaciones clínicamente significativas ni con las dosis de 25 µg ni con las dosis de 50 µg. De cada una de las determinaciones realizadas, el valor de la media poblacional se encontró siempre dentro del rango normal del laboratorio, en cada uno de los puntos de control. Ninguna variación ha tenido significancia clínica con ninguna de las dos dosis estudiadas. Las



alteraciones de laboratorio individuales más frecuentes detectadas en los distintos puntos de evaluación fueron variaciones hematológicas inespecíficas y aumento de la proteína C reactiva. La severidad en todos los casos fue de grado 1, leve y no se detectaron diferencias entre las dosis de 25 µg y 50 µg.

En cuanto a inmunogenicidad los resultados más significativos se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1: Inmunogenicidad humoral luego 1 aplicación de vacuna**

Parámetro	Variante					
	Wuhan		Gamma		Ómicron BA.1	
	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
GMR a los 14 días	12,6x	29,9x	16,6x	30,9x	12,8x	29,9x
% seroconversión a los 14 días	88,3	90,0	90,0	85,0	93,3	85,0
GMR a los 28 días	9,23x	14,2x	8,5x	12,7x	8,91x	14,25x
% seroconversión a los 28 días	82,8	83,3	75,9	83,3	75,9	83,3

GMR = cociente entre la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes luego de vacunación y antes de vacunar.

% seroconversión = porcentaje de participantes que multiplicó su título de anticuerpos neutralizantes al menos 4 veces respecto del valor basal.

#### EN CUANTO A LA INMUNOGENICIDAD CELULAR:

- A los 28 días de recibida una dosis de ARVAC 25 µg la frecuencia de linfocitos T específicos secretores de IFN- medida por el método ELISPOT pasó de una media de  $18,66 \pm 3,55$  spots/millón de PBMCs (células de sangre periféricas mononucleadas) a  $65,55 \pm 14$  spots/millón de PBMCs. ( $p < 0,0001$  para la dosis de 25 µg).

- A los 28 días de recibida una dosis de ARVAC 50 µg la frecuencia de linfocitos T específicos secretores de IFN- medida por el método ELISPOT pasó de una media de  $12,24 \pm 3,15$  spots/millón de PBMCs (células de sangre periféricas mononucleadas) a  $31,13 \pm 7,54$  spots/millón de PBMCs. ( $p = 0,0302$  para la dosis de 50 µg).

Además, a modo exploratorio se determinó la inmunogenicidad de ARVAC en su versión Gamma contra otras variantes del virus SARS-CoV-2 no incluidas en el protocolo, observándose que la vacuna con variante Gamma en las concentraciones de 25 y 50 µg de antígeno resulta inmunogénica contra Delta y Ómicron BA.5.

En base al perfil de seguridad hallado y a los resultados de inmunogenicidad, se seleccionó la dosis de 50 µg para el estudio clínico fase 2/3 dado que esta dosis evidenció un mayor incremento en la media geométrica de los títulos de anticuerpos neutralizantes manteniendo un muy buen perfil de seguridad.

El estudio de fase 2/3 se diseñó para investigar ARVAC como vacuna de refuerzo de esquemas de vacunación completo de otras vacunas, dada la situación epidemiológica mundial. Se trató de un estudio doble ciego, aleatorizado, cruzado, controlado contra placebo, multicéntrico diagramado en dos etapas de reclutamiento en Argentina.

En la primera etapa se incluyeron voluntarios sanos ( $n = 232$ ) de 18 a 60 años, sin comorbilidades previas, a los que se les administró una dosis de vacuna de 50 µg de antígeno variante Gamma y placebo en diseño doble cruzado, de modo tal que todos los participantes recibieron una dosis de vacuna y una de placebo. A los que se les realizó un dosaje de anticuerpos neutralizantes basal y a los 14 días de la administración de placebo y vacuna.



En la segunda etapa, se incluyeron voluntarios de 18 años o mayores, sanos o con comorbilidades estables o controladas, a quienes también se les administró una dosis de vacuna de 50 µg de antígeno y placebo, y a

quienes también se les realizó un dosaje de anticuerpos basal y a los 14 días de la aplicación de la vacuna y del placebo. Se estudiaron tres versiones de ARVAC:

- ARVAC versión Gamma conteniendo 50 µg de antígeno basado en RBD Gamma
- ARVAC versión Ómicron conteniendo 50 µg de antígeno basado en RBD Ómicron
- ARVAC versión Bivalente conteniendo 25 µg de antígeno basado en RBD Gamma y 25 µg de antígeno basado en RBD Ómicron que es la composición actual de ARVAC

Es esta segunda etapa, los voluntarios fueron aleatorizados a recibir vacuna variante gamma, ómicron o Bivalente.

Como objetivo primario se estudió la inmunogenicidad de las versiones Gamma, Ómicron y bivalente de ARVAC en base a la tasa de seroconversión. Se considera que ha habido seroconversión si a los 14 días de la aplicación del candidato vacunal o de su placebo comparador, se cumple con alguno de los siguientes criterios:

- el título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 contenidas en el candidato vacunal sea al menos 4 veces mayor respecto del basal.
- el título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal sea al menos 2 veces superior respecto del título basal, siempre que dicho título basal frente a la variante Wuhan sea igual o mayor a 949 unidades internacionales/ml. (Aclaración: este valor de 949 UI/ml es apenas menor a un valor correlacionado con un 90 % de protección reportado en la literatura y es muy superior a un valor correlacionado con el 80 % de protección)

Los objetivos secundarios del estudio incluyeron también la tasa de seroconversión frente a las otras variantes de SARS-CoV-2 para cada versión vacunal de ARVAC (Gamma, Ómicron y Bivalente), el incremento del título de anticuerpos neutralizantes y su media geométrica y el seguimiento de eventos adversos y datos de laboratorio de los participantes:

Los resultados de inmunogenicidad obtenidos en todos los participantes de la etapa 2 del estudio de fase 2/3 en la que se estudiaron las tres versiones de ARVAC – Gamma, Ómicron y Bivalente - se resumen en la tabla 2.



**Tabla 2. Tasas de seroconversión de ARVAC en adultos regogados en la etapa 2 del estudio de fase 2/3 (mayores de 18 años)**

Tratamiento	Versión N	SARS-CoV-2	%*	IC95%		Fisher vs. Placebo	>75% (z-test) (P)
				LI	LS		
Placebo	N=264	Wuhan	12,5	9,0	17,0		
		Gamma	12,1	8,7	16,6		
		Ómicron BA.5	15,2	11,3	20,0		
ARVAC	Gamma N=265	Wuhan	86,8	82,2	90,3	P<0,0001	P=0,000009
		Gamma	84,2	79,3	88,1	P<0,0001	P=0,0006
		Ómicron BA.5	81,9	76,8	86,1	P<0,0001	P=0,010
	Ómicron BA.4/5 N=265	Wuhan	80,0	74,8	84,4	P<0,0001	P=0,06
		Gamma	82,3	77,2	86,4	P<0,0001	P=0,006
		Ómicron BA.5	87,5	83,0	91,0	P<0,0001	P=0,000002
	Bivalente N=259	Wuhan	92,7	88,8	95,3	P<0,0001	P=0,00000000005
		Gamma	91,1	87,0	94,0	P<0,0001	P=0,000000002
		Ómicron BA.5	92,7	88,8	95,3	P<0,0001	P=0,00000000005

\* Seroconversión a los 14 días de la administración del producto en investigación o placebo, definida por alguno de los 2 criterios siguientes: a) título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 4 veces mayor respecto del basal; o b) título de anticuerpos neutralizantes contra la o las variantes de SARS-CoV-2 del o de los antígenos contenidos en el candidato vacunal al menos 2 veces superior respecto del título basal, siempre que los niveles de anticuerpos basales frente a la variante Wuhan sean mayores a 949 UI/ml.

Como se puede apreciar la vacuna ARVAC en su versión Bivalente presentó la mayor tasa de seroconversión y cumplió ampliamente con los objetivos primarios del estudio. La tasa de seroconversión contra las variantes Wuhan, Gamma y Ómicron BA.5 estuvo entre 91,9 y 92,8 %.

Asimismo, el título de anticuerpos neutralizantes a los 14 días de aplicado el tratamiento con versión bivalente de ARVAC se multiplicó 12,2 veces contra variante Wuhan, 12,3 contra variante Gamma y 15,2 veces contra variante Ómicron BA.5. El placebo no tuvo efecto multiplicativo en esta evaluación, lo cual muestra que es un efecto inmunogénico de ARVAC.

Por otro lado, se midieron los niveles de anticuerpos neutralizantes en UI/mL resultando que el 88,7 % de todos los participantes de la etapa 2, el 87,9 % de los participantes entre 18 y 60 años y el 90,6 % de los participantes de más de 60 años alcanzaron un título mayor o igual a 1030 UI/mL que correlaciona con un nivel de protección del 90 % contra COVID-19 sintomático según la literatura.

También se determinó en forma exploratorio incremento de 10,3 veces de anticuerpos IgG contra Spike en plasma de 781 participantes y un incremento significativo de anticuerpos IgA contra la subunidad S1 de Spike en saliva (mucosas) de 111 participantes de la etapa 2 del estudio clínico de fase 2/3.

Los eventos adversos locales reportados durante el estudio de fase 2/3 se detallan en la siguiente tabla:



**Tabla 4: Eventos adversos locales solicitados reportados en el estudio de fase 2/3**

Total		Vacuna (n=1961)				Placebo (n=1957)				Valor de p (**)
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (#)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (#)	
Dolor espontáneo	n	810	31	0	841	601	11	1	613	<0,001
	%#	96,3	3,7	0,0	42,9	98,0	1,8	0,2	31,3	
Sensibilidad/Molestia	n	565	69	4	638	385	30	2	417	<0,001
	%#	88,6	10,8	0,6	32,5	92,1	7,2	0,5	21,3	
Eritema/enrojecimiento	n	74	3	0	77	44	1	0	45	NS (0,660)
	%#	96,1	3,9	0,0	3,9	97,8	2,2	0,0	2,3	
Hinchazón/Induración	n	155	3	0	158	73	0	0	73	NS (0,257)
	%#	98,1	1,9	0,0	8,1	100,0	0,0	0,0	3,7	
Prurito/Picazón	n	54	0	0	54	28	1	0	29	NS (0,987)
	%#	100,0	0,0	0,0	2,8	96,6	3,4	0,0	1,5	

Los datos se presentan como número de sujetos por grupo de voluntarios en función del producto de investigación recibido (vacuna o placebo), y en función de la severidad del evento reportado. Se incluyen todas las dosis administradas de vacuna y de placebo.

(\*) Porcentaje en función del total de voluntarios por grupo de tratamiento.

(#) Porcentaje en función del número total del evento reportado.

(\*\*) Prueba de chi cuadrado.

La clasificación de toxicidad se ha realizado de acuerdo con las Guías para la Industria – Escalas de Graduación de Toxicidad para Voluntarios Sanos Adultos Mayores y Adolescentes Enrolados en Ensayos Clínicos de Vacunas Profilácticas (CBER – FDA, 2007).



Los eventos adversos sistémicos solicitados reportados durante el estudio de fase 2/3 se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 4.13: Eventos adversos sistémicos solicitados reportados en el estudio de fase 2/3**

Evento		Vacuna (n=1961)					Placebo (n=1957)				Valor de p (**)
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Total (*)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total (*)	
Diarrea	n	43	3	1		47	38	1		39	NS (0,388)
	%#	91,5	6,4	2,1		2,4	97,4	2,6		2,0	
Dolor de cabeza/Cefalea	N	203	37	2		242	170	17	1	188	0,006
	%#	83,9	15,3	0,8		12,3	90,4	9,0	0,5	9,6	
Dolores articulares	N	48	7	1		56	39	7		46	NS (0,321)
	%#	85,7	12,5	1,8		2,9	84,8	15,2		2,4	
Dolores musculares/Mialgias	N	103	15	1		119	93	14		107	NS (0,420)
	%#	86,6	12,6	0,8		6,1	86,9	13,1		5,5	
Escalofríos	N	34	7	1		42	26	3		29	NS (0,122)
	%#	81,0	16,7	2,4		2,1	89,7	10,3		1,5	
Fatiga/Cansancio/Decaimiento	N	206	23	2	1	232	169	19		188	0,024
	%#	88,8	9,9	0,9	0,4	11,8	89,9	10,1		9,6	
Fiebre	N	22	6	1		29	14	1		15	0,034
	%#	75,9	20,7	3,4		1,5	93,3	6,7		0,8	
Náuseas	N	32	2			34	31	3		34	NS (0,993)
	%#	94,1	5,9			1,7	91,2	8,8		1,7	
Palpitaciones	N	15	3			18	12	1		13	NS (0,370)
	%#	83,3	16,7			0,9	92,3	7,7		0,7	
Somnolencia	N	196	24	2		222	183	16		199	NS (0,243)
	%#	88,3	10,8	0,9		11,3	92,0	8,0		10,2	
Vómitos	N	6				6	3	3		6	NS (0,997)
	%#	100,0				0,3	50,0	50,0		0,3	

Los datos se presentan como número de sujetos por grupo de voluntarios en función de la variante de la vacuna recibida, y en función de la severidad del evento reportado.

(\*) Porcentaje en las columnas coloreadas indica la incidencia de los eventos en función del total de las dosis aplicadas.

(#) Los porcentajes presentados en las filas debajo de cada valor absoluto, representa la incidencia de los eventos en función de su severidad, en relación con el total de casos de ese evento.

(\*\*) Prueba de chi cuadrado.

La clasificación de toxicidad se ha realizado de acuerdo con las Guías para la Industria – Escalas de Graduación de Toxicidad para Voluntarios Sanos Adultos Mayores y Adolescentes Enrolados en Ensayos Clínicos de Vacunas Profilácticas (CBER – FDA, 2007).



## POSOLOGÍA Y MODO DE ADMINISTRACIÓN

ARVAC Vacuna contra COVID-19 de subunidad proteica RBD se administra por vía intramuscular preferente en la región deltoidea del brazo menos hábil, en una dosis de 0,5 ml.

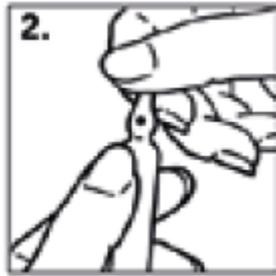
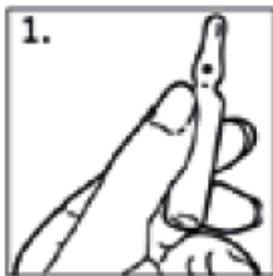
### PREPARACIÓN DEL INYECTABLE

#### -Frasco – ampolla monodosis

Se retira el frasco-ampolla del envase original, se homogeneiza por inversión suave y se carga la jeringa perforando el tapón de caucho con la aguja extrayendo una dosis de 0,5 ml que luego se aplica por vía intramuscular preferentemente en la región deltoidea.

#### -Ampolla monodosis

Se retira la ampolla del envase original, se homogeneiza por inversión suave y se carga la jeringa abriendo la ampolla por presión del dedo colocándolo en la parte posterior del punto de corte indicado en la misma (ver imágenes 1; 2 y 3) extrayendo una dosis de 0,5 ml que luego se aplica por vía intramuscular en la región deltoidea.



#### -Frasco-ampolla multidosis (10 dosis de 0,5 ml)

Se retira el frasco-ampolla del envase original, se homogeneiza por inversión suave y se cargan 10 jeringas perforando cada vez el tapón de caucho y extrayendo 0,5 ml en cada una. La vacuna se aplica luego por vía intramuscular preferentemente en la región deltoidea. Se descarta el remanente que pudiera quedar en el frasco-ampolla original.

### CONTRAINDICACIONES

No debe administrarse esta vacuna a personas:

- Con historial de hipersensibilidad severa (p.ej. anafilaxis) a alguno de los componentes de la vacuna o a la vacuna en una aplicación anterior.
- Con alguna contraindicación para recibir inyecciones intramusculares.

### ADVERTENCIAS

No debe administrarse esta vacuna a personas con historial de hipersensibilidad severa (p.ej. anafilaxis) a alguno de los componentes de la vacuna o a la vacuna en una aplicación anterior.



## PRECAUCIONES

Como es habitual al administrar una vacuna, se recomienda permanecer en observación al menos 15 minutos después de la aplicación de la vacuna, para detectar precozmente eventuales reacciones de hipersensibilidad.

Interacciones con otros medicamentos y otras interacciones

No se han estudiado interacciones con otros medicamentos, ni se ha estudiado la aplicación concomitante de otras vacunas.

### *-Embarazo*

No se ha estudiado ARVAC en embarazadas.

### *-Lactancia*

No se ha estudiado ARVAC en mujeres lactantes.

### *-Fertilidad*

No existen datos clínicos sobre la influencia de ARVAC sobre la fertilidad.

### *-Efectos sobre la capacidad de conducir y utilizar máquinas*

No se realizaron estudios con respecto a los efectos sobre la capacidad de conducción de vehículos y la manipulación de máquinas. Como es habitual, al administrar una vacuna, las personas deben esperar al menos 15 minutos antes de poder alejarse del centro de vacunación por potenciales problemas de hipersensibilidad.

### *-Empleo en pediatría*

No se ha estudiado ARVAC en niños, ni en adolescentes.

### *-Empleo en ancianos*

ARVAC en su versión bivalente es una vacuna de refuerzo eficaz y segura contra COVID-19 en personas mayores de 60 años que cuenten con un esquema completo de vacunación primaria contra esta enfermedad.

## REACCIONES ADVERSAS

Las reacciones adversas detectadas en los voluntarios que recibieron ARVAC durante los estudios clínicos de fase 1 y de fase 2/3 se detallan a continuación:

En el estudio de fase 1 (n=80 voluntarios) las reacciones adversas solicitadas locales y sistémicas reportadas fueron:

- muy frecuentes ( 1/10): molestias/sensibilidad en el sitio de inyección, dolor en el sitio de inyección, somnolencia,

dolor de cabeza, fatiga/cansancio y mialgias.

- frecuentes ( 1/100, < 1/10): eritema/enrojecimiento, hinchazón/induración y prurito/picazón en el sitio de inyección.

En el estudio de fase 2/3 (n=1232 voluntarios) las reacciones adversas reportadas fueron:

### Locales:

- muy frecuentes ( 1/10): dolor espontáneo en el sitio de aplicación, sensibilidad/molestia en el sitio de aplicación



- frecuentes ( 1/100, < 1/10): eritema/enrojecimiento, hinchazón/induración y prurito/picazón en el sitio de inyección

Sistémicas:

- muy frecuentes ( 1/10): dolor de cabeza, fatiga/cansancio/decaimiento y somnolencia.

- frecuentes ( 1/100, < 1/10): dolores musculares/mialgias, dolores articulares, náuseas, diarrea, fiebre y escalofríos.

- infrecuentes ( 1/1000, < 1/100): palpitaciones y vómitos.

Los eventos adversos no solicitados reportados como posible, probable o definitivamente asociados al producto en investigación en el estudio de fase 2/3 se resumen en el siguiente cuadro clasificados por órgano y sistema:



**Tabla 5.13: Eventos adversos no solicitados reportados en el estudio de fase 2/3**

Clasificación por órgano y sistema	Eventos adversos	ARVAC (n = 1961)	Placebo (n = 1957)	Valor de p (*)
Exploraciones complementarias	Aumento de leucocitos	4	1	NS (0,318)
	Aumento del recuento plaquetario	1	—	
	Aumento de eosinófilos	—	1	
	Aumento de enzimas hepáticas	—	1	
	TGO elevada	3	3	
	TGP elevada	1	3	
	LDH elevada	3	1	
	PCR elevada	1	—	
	Alteración análisis de orina	1	—	
	Aumento de bilirrubina total	1	—	
Infecciones e infestaciones	Faringoamigdalitis bacteriana	—	1	NS (0,317)
Trastornos cardíacos	Palpitaciones	—	2	NS (0,157)
	Dolor en oído derecho	1	—	NS (0,999)



Trastornos del oído y del laberinto	Otalgia	—	1	
Trastornos del sistema nervioso	Hormigueo en el brazo	1	—	NS (0,108)
	Insomnio	4	—	
	Mareos	4	4	
	Disestesia en miembro inferior izquierdo	1	—	
	Parestesias	2	2	
	Temblor en pierna izquierda	1	—	
Trastornos gastrointestinales	Malestar estomacal	1	—	NS (0,298)
	Dolor abdominal	3	2	
	Dolor de garganta / odinofagia	8	7	
	Gusto raro al tragar	1	—	
	Síndrome gastrointestinal	1	—	
Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración	Hematoma en el sitio de aplicación	6	1	<b>0,005</b>
	Sed	1	—	
	Sequedad de garganta	1	—	
	Síndrome gripal	6	—	



	Síndrome pseudogripal	1	1	
	Sudoración	2	1	
	Calor corporal	1	—	
	Malestar en el cuello	—	1	
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	Dolor en el brazo	2	1	NS (0,318)
	Artralgia y artritis rodilla derecha	1	—	
	Dolor lumbar, lumbalgia, dolor de espalda	2	2	
	Dolor en articulación del codo	1	—	
Trastornos oculares	Sensibilidad a la luz	2	—	NS (0,565)
	Cansancio en la vista	—	1	
Trastornos renales y urinarios	Proteinuria	—	1	NS (0,317)
Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos	Rinitis, Rinorrea	5	4	NS (0,276)
	Tos	3	1	
	Falta de aire	1	—	
	Congestión nasal	3	2	
	Sensibilidad nasal	1	—	



	Broncoespasmo	—	1	
Trastornos de la piel y del tejido celular subcutáneo	Rash cutáneo en el sitio de inyección	1	—	NS (0,562)
	Rash vesicular en rostro	—	1	
	Sarpullido en codos	—	1	
Trastornos vasculares	Epistaxis	1	—	NS (0,218)
Trastornos del aparato reproductor y de la mama	Alteración del ciclo menstrual	2	—	NS (0,158)
Trastornos de la sangre y del sistema linfático	Adenopatía axilar	1	—	NS (0,656)
	Hematocrito disminuido	1	—	
	Empeoramiento de la anemia	1	—	
	Inflamación zona axilar	—	2	

En la **Tabla 5** se presenta la frecuencia y el porcentaje de la incidencia de eventos adversos considerados relacionados (definitiva, probable o posiblemente relacionados) con la aplicación del producto en estudio (vacuna o placebo), clasificados por órgano y sistema. Se presenta la incidencia estimada en función de la cantidad de dosis totales aplicadas de cada variante de vacuna, y comparativamente entre vacuna y placebo. Los trastornos generales fueron significativamente más frecuentes con la vacuna, aunque en todos los casos la incidencia fue menor al 1%. (\*) Prueba de chi cuadrado.

No se observaron reacciones adversas serias relacionadas con la aplicación de ARVAC Vacuna contra COVID-19 de subunidad proteica RBD, ni modificaciones de datos de laboratorio de relevancia clínica en ninguno de los estudios clínicos realizados.

### SOBREDOSIFICACIÓN

Ante la eventualidad de una sobredosificación, concurrir al hospital más cercano o comunicarse con los Centros de Toxicología:

Hospital de Pediatría Dr. Ricardo Gutiérrez: (011) 4962-6666



Hospital Dr. Alejandro Posadas: (011) 4658-7777  
Optativamente otros Centros de Intoxicaciones

## PRESENTACIONES

Envase conteniendo un frasco-ampolla monodosis (1 dosis de 0,5 ml)

## CONSERVACIÓN

Conservar en su envase original entre 2 y 8 °C. No congelar

## MANTENER ESTE Y TODOS LOS MEDICAMENTOS FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS

Este medicamento debe ser usado bajo prescripción médica y no puede repetirse sin una nueva receta médica  
Especialidad Medicinal autorizada por el Ministerio de Salud.

Certificado N°: 59.957

LABORATORIO PABLO CASSARÁ S.R.L.

Carhué 1096/86, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Director Técnico: Federico Ernesto Montes de Oca, Farmacéutico.

Elaborado en: Carhué 1096/86, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.



### Referencias bibliográficas

1. Zhu, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733 (2020).
2. Gralinski, L.E. & Menachery, V.D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 12 (2020).
3. Wu, Z. & McGoogan, J.M. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 323, 1239-1242 (2020).
4. WHO (2023). Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. Recuperado el 18/12/2023 de: <https://www.who.int/news/item/13-12-2023-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines>
5. ICMRA (2023, 8 de mayo). COVID-19 Omicron Variant Workshop. Recuperado el 5 de diciembre de 2023 de: <https://icmra.info/drupal/en/covid-19/8may2023>
6. European Medicines Agency (EMA) (2023). ECDC-EMA statement on updating COVID-19 vaccines composition for new SARS-CoV-2 virus variants. Recuperado de: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/ecdc-ema-statement-updating-covid-19-vaccines-composition-new-sars-cov-2-virus-variants\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/ecdc-ema-statement-updating-covid-19-vaccines-composition-new-sars-cov-2-virus-variants_en.pdf)
7. European Medicines Agency [EMA] (2023). Assessment report – COMIRNATY (variación de bivalente a XBB) Disponible en [https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/comirnaty-h-c-005735-ii-0183-epar-assessment-report-variation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/comirnaty-h-c-005735-ii-0183-epar-assessment-report-variation_en.pdf)
8. FDA (2023). Emergency Use Authorization (EUA) for an Unapproved Product Review Memorandum. Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine (2023-2024 Formula). Disponible en: <https://www.fda.gov/media/172019/download?attachment>
9. Fergie, J. & Srivastava, A. Immunity to SARS-CoV-2: Lessons Learned. *Front Immunol* 12, 654165 (2021).
10. Hotez, P.J. & Bottazzi, M.E. Developing a low-cost and accessible COVID-19 vaccine for global health. *PLoS Negl Trop Dis* 14, e0008548 (2020).
11. Dai, L. & Gao, G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol* 21, 73-82 (2021).
12. Yang, S. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Infect Dis* (2021).
13. Slota, M., Lim, J. B., Dang, Y. & Disis, M. L. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines* 10, 299-306, doi:10.1586/erv.10.169 (2011)
14. Pasquevich, K. A. et al. Safety and immunogenicity of a SARS-CoV-2 Gamma variant RBD-based protein adjuvanted vaccine used as booster in healthy adults. *Nat Commun* 14, 4551, doi:10.1038/s41467-023-40272-3 (2023)
15. Feng, S., et al., Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*, 2021. 27(11): p. 2032-2040.
16. Khoury, D.S., et al., Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*, 2021. 27(7): p. 1205-1211.
17. Goldblatt, D., et al., Towards a population-based threshold of protection for COVID-19 vaccines. *Vaccine*, 2022. 40(2): p. 306-315



18. Gilbert, P. B. et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science* 375, 43-50, doi:10.1126/science.abm3425 (2022).
19. Branche, A.R., et al., Immunogenicity of the BA.1 and BA.4/BA.5 SARS-CoV-2 Bivalent Boosts: Preliminary Results from the COVAIL Randomized Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 2023.
20. Corominas, J., et al., Safety and immunogenicity of the protein-based PHH-1V compared to BNT162b2 as a heterologous SARS-CoV-2 booster vaccine in adults vaccinated against COVID-19: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority phase IIb trial. *Lancet Reg Health Eur*, 2023. 28: p. 100613.
21. Munro, A.P.S., et al., Safety, immunogenicity, and reactogenicity of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccines given as fourth-dose boosters following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 and a third dose of BNT162b2 (COV-BOOST): a multicentre, blinded, phase 2, randomised trial. *Lancet Infect Dis*, 2022. 22(8): p. 1131-1141.
22. Bhiman, J.N., et al., Novavax NVX-COV2373 triggers neutralization of Omicron sub-lineages. *Scientific Reports*, 2023. 13(1): p. 1222.
23. Yechezkel, M., et al., Safety of the fourth COVID-19 BNT162b2 mRNA (second booster) vaccine: a prospective and retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*, 2023. 11(2): p. 139-150.
24. Launay, O., et al., Immunogenicity and Safety of Beta-Adjuvanted Recombinant Booster Vaccine. *N Engl J Med*, 2022. 387(4): p. 374-376.
25. Magen, O., et al., Fourth Dose of BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *N Engl J Med*, 2022. 386(17): p. 1603-1614.
26. Chalkias, S., et al., A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*, 2022. 387(14): p. 1279-1291.
27. Menegale F, et al. Evaluation of Waning of SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immunity A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*. 2023; 6(5): e2310650. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.10650
28. Coria, L. M. et al. A Gamma-adapted recombinant subunit vaccine induces broadly neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants and protects mice from SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv*, 2023.2001.2003.522213, doi:10.1101/2023.01.03.522213 (2023)
29. Sheward, D. J. et al. Beta RBD boost broadens antibody-mediated protection against SARS-CoV-2 variants in animal models. *Cell Rep Med* 2, 100450, doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100450 (2021)