

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 567**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2021 PCT/EP2021/071298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2022 WO22029009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2021 E 21763011 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 4192845**

54 Título: **Péptidos y combinaciones de péptidos para su uso en inmunoterapia contra una infección por SARS-CoV-2 (COVID-19)**

30 Prioridad:

07.08.2020 EP 20190070

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.01.2025

73 Titular/es:

**EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN,
MEDIZINISCHE FAKULTÄT (100.00%)
Geschwister-Scholl-Platz
72074 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**WALZ, JULIANE;
NELDE, ANNIKA;
RAMMENSEE, HANS-GEORG y
BILICH, TATJANA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 567 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos y combinaciones de péptidos para su uso en inmunoterapia contra una infección por SARS-CoV-2 (COVID-19)

5 La presente invención se refiere a péptidos para su uso en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a epítopos de péptidos de células T asociados a SARS-CoV-2 que sirven como principios farmacéuticos activos de composiciones de vacuna que estimulan respuestas inmunitarias anti-SARS-CoV-2. Los péptidos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), o péptidos como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, receptores de células T solubles, y otras moléculas de unión.

10 La presente invención se refiere a varias secuencias peptídicas novedosas que pueden usarse en composiciones de vacuna para provocar respuestas inmunitarias anti-SARS-CoV-2, o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica/inmunológicamente activos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, más particularmente al campo de la inmunología molecular.

15 **Antecedentes de la invención**

El nuevo coronavirus SARS-CoV-2 es responsable de la enfermedad del COVID-19, que especialmente en pacientes ancianos, debilitados e inmunodeprimidos muestra cursos graves y fatales. Mientras tanto, SARS-CoV-2 se ha extendido a una pandemia mundial con consecuencias de salud, económicas y socio-políticas aún incalculables. Hasta ahora, no hay terapias establecidas y aún no está disponible una vacuna.

20 Las muertes y enfermedades graves son más comunes en la población mayor de más de 60 años de edad. Se han observado brotes en instalaciones de cuidados a largo plazo en varios países, que plantean desafíos particulares en términos de contención y aislamiento dentro de la instalación, afectando y amenazando a los que más corren el riesgo. Para pacientes mayores con infección por SARS-CoV-2, se ha descrito una alta tasa de hospitalización entre el 28,6% y el 43,5% en el grupo de edad de 65-74 años y entre el 30,5% y el 58,7% en el grupo de edad de 75-84 años, con una alta tasa de mortalidad asociada de hasta el 30%.

25 Existen dos opciones prometedoras para reducir el número de casos de COVID-19 graves en ancianos y personas comórbidas en el futuro. La primera opción se refiere al desarrollo de medidas preventivas (vacunación) que previenen la enfermedad o reducen su progresión. La segunda opción se refiere a una intervención terapéutica en estadios tempranos. Ambos enfoques pueden prevenir el deterioro en el curso de la enfermedad, reducir la frecuencia de ingresos hospitalarios y tratamiento de cuidados intensivos y, por lo tanto, aliviar la presión del sistema de salud.

30 La inmunidad de las células T desempeña un papel esencial en el control de las infecciones víricas. Las células T CD4⁺ auxiliares (Th1) son esenciales para la regulación y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria y para la producción de citocinas antivirales, mientras que las células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) son responsables de la eliminación de células infectadas por virus. El reconocimiento de antígenos virales, que se presentan como péptidos cortos a través del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), es esencial para la activación y función de las células T. Para identificar y analizar las respuestas inmunitarias protectoras de células T contra infecciones virales en la población humana, es necesaria una identificación y caracterización completa de dichos epítopos de células T virales. Este conocimiento no sólo es esencial para entender la respuesta inmunitaria del huésped y los mecanismos de protección a largo plazo en caso de recurrencia del virus, sino también un requisito previo para el desarrollo de enfoques de inmunoterapia terapéutica y preventiva nuevos y más eficaces. Además de la generación de células T específicas del virus *ex vivo* con la posterior transferencia al paciente, la posibilidad de vacunación directa con epítopos de células T para la inducción de una respuesta de células T directamente *in vivo* es de particular importancia. Dichas vacunas pueden usarse profilácticamente en pacientes con alto riesgo de un curso grave de infección por SARS-CoV-2 para generar inmunidad contra la infección. Además, también pueden usarse terapéuticamente para prevenir cursos graves de enfermedad mediante la aceleración/generación de una respuesta de células T específicas del virus y la activación *in vivo* de células B específicas del virus que soportan la producción de anticuerpos.

35 Los descubrimientos y experiencia con otros dos coronavirus zoonóticos - SARS-CoV-1 y MERS-CoV - basados en la detección de las respuestas de células T CD8⁺ específicas de CoV y células T CD4⁺ de memoria de larga duración⁺ en convalecientes proporcionan evidencia de que la inmunidad de células T también desempeña un papel importante en el control de infecciones por coronavirus. Channappanavar et al. Virus-specific memory CD8 T-cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. J Virol. 2014; 88(19):11034-11044; Channappanavar et al. T-cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. 2014; 59(1-3):118-128; Zhao et al. Airway Memory CD4(+) T-cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses. Immunity. 2016; 44(6):1379-1391; Zhao et al. T-cell responses are required for protection from clinical disease and for virus clearance in severe acute respiratory syndrome coronavirus infected mice. J Virol. 2010; 84(18):9318-9325. Esto es incluso más importante ya que los estudios sobre la inmunidad humoral contra SARS-CoV-1 proporcionaron evidencia de que las respuestas de anticuerpos son de corta duración e incluso pueden provocar o agravar la patología

pulmonar asociada al virus. Liu et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*. 2019; 4(4); Tang et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011;186(12):7264-7268. Para las células T CD8⁺ y CD4⁺ Th1, en contraste, se reportó un papel crucial en la eliminación viral y la protección contra la infección mortal por SARS-CoV-1, especialmente en términos de patología pulmonar notificada.

Se han descrito numerosos epítomos de células T CD4⁺ y CD8⁺ para SARS-CoV-1 y MERS-CoV, que, debido a la homología de secuencia de los dos coronavirus, sugieren una reactividad cruzada potencial y también podrían ser epítomos de células T potenciales para el nuevo virus SARS-CoV-2; Liu et al. T-cell immunity of SARS-CoV: Implications for vaccine development against MERS-CoV. *Antiviral Res*. 2017; 137:82-92.

Con respecto al SARS-CoV-2, dos estudios muy recientes describieron las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ contra conjuntos de péptidos virales en donantes que se habían recuperado de COVID-19, así como individuos no expuestos a SARS-CoV-2, indicativas de reactividad cruzada potencial de células T; véase Grifoni et al. Targets of T-cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; Braun et al. Presence of SARS-CoV-2 reactive T-cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*. 2020:2020.2004.2017.20061440.

En un trabajo propio preliminar, los inventores definieron epítomos de células T CD4⁺ y CD8⁺ de reactividad cruzada y específicos de SARS-CoV2 en una gran colección de convalecientes de SARS-CoV-2 así como individuos no expuestos y confirmaron su relevancia para la inmunidad y el curso de la enfermedad de COVID-19; véase Nelde et al. SARS-CoV-2 T-cell epitopes define heterologous and COVID-19-induced T-cell recognition. In: Preprint, ed. Research Square 2020. Estos epítomos de células T de SARS-CoV-2 muestran altas frecuencias de reconocimiento en convalecientes de infección por SARS-CoV-2, lo que sugiere su importante papel en el curso natural y el control inmunitario de COVID-19.

Rammensee et al. Designing a therapeutic SARS-CoV-2 T-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups. 11 May 2020, preprint (versión 1), disponible en Research Square, describen una vacuna basada en una mezcla de epítomos de CD4⁺ y CD8⁺ derivados de SARS-CoV-2.

En la solicitud de Patente Europea publicada EP3892297 se describen diversas secuencias peptídicas específicas de SARS-CoV-2 que se proponen como principios activos de una preparación de vacunación contra COVID-19.

Actualmente, se evalúan en ensayos clínicos varias vacunas basadas en péptidos, para virus tales como EBV, HBV, enfermedad de la fiebre aftosa, fiebre porcina, ántrax, malaria, virus de la inmunodeficiencia humana y virus de la gripe.

Sin embargo, hasta ahora las secuencias peptídicas específicas de SARS-CoV-2 descritas hasta ahora no se han probado en la práctica y especialmente no en uso clínico. En particular, no está disponible ninguna vacuna basada en péptidos eficaz contra una infección por SARS-CoV-2.

Es, por lo tanto, un objetivo fundamental de la invención proporcionar epítomos de células T derivados de SARS-CoV-2 que puedan usarse para desarrollar medicamentos y métodos terapéuticos para la profilaxis y el tratamiento de una infección por SARS-CoV-2 (COVID-19), que también puedan permitir una mejor comprensión de la biología del SARS-CoV-2 y su transmisión.

La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Compendio de la invención

La presente divulgación proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 y/o que consiste en SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, y secuencias variantes de las mismas que son homólogas en al menos un 88% a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, y en donde dicha variante se une a molécula(s) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y/o induce a las células T que reaccionan de manera cruzada con dicho péptido variante; y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde dicho péptido no es un polipéptido de longitud completa.

Los inventores fueron capaces de predecir diez y seis péptidos HLA-DR promiscuos a partir de diferentes proteínas o marcos de lectura abiertos (ORFs) del virus SARS-CoV-2, respectivamente. Usando el algoritmo SYFPEITHI, se seleccionaron secuencias peptídicas que muestran una puntuación de unión alta para varios alotipos de HLA-DR y, por lo tanto, pueden usarse ampliamente en la población.

Además, los inventores seleccionaron especialmente aquellos péptidos HLA-DR que contienen secuencias de HLA de clase I embebidas para inducir las respuestas de células T CD4⁺ así como las respuestas de células T CD8⁺.

Además, para péptidos de proteínas de superficie de virus, sólo se seleccionaron secuencias que no representan epítomos de anticuerpos, ya que no son accesibles a anticuerpos debido a la estructura 3D predicha de la proteína. Esto debería prevenir la formación de anticuerpos contra los péptidos vacunados, lo que podría conducir posiblemente a un deterioro de la patología pulmonar.

- 5 Se probó la inmunogenicidad para todos los péptidos HLA-DR incluidos en una mezcla de péptidos en una gran cohorte de donantes convalecientes de SARS-CoV-2 que prueban el papel significativo de estos epítomos de células T en el curso natural de la infección por SARS-CoV-2. Además, se aplicaron dos secuencias peptídicas en un enfoque de vacunación en un único voluntario sano, induciendo fuertes respuestas de células T CD4⁺.

- 10 Los péptidos HLA-DR derivados de SARS-CoV-2 según la invención activan las células CD4⁺ Th1 que contribuyen directamente a la eliminación del virus y suministran fuertes señales de T-auxiliares a las célula T CD8⁺ cebadas por secuencias de HLA de clase I embebidas en una vacuna o durante infección natural. Además, en términos de una infección por SARS-CoV-2, estas células CD4⁺ Th1 específicas de SARS-CoV-2 deberían activar de manera vigorosa las células B experimentadas por antígeno vírico. La actividad potenciada resultante podría conducir a una eliminación más rápida del virus y la prevención del curso grave de COVID-19.

- 15 Los inventores fueron capaces de demostrar en un ensayo clínico donde se administraron los péptidos según la divulgación que no se producían sucesos adversos graves en los sujetos de estudio. La reactogenicidad sistémica estaba ausente o era leve en todos los participantes. Las respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 dirigidas a múltiples péptidos se indujeron mediante una dosis única en todos los participantes que comprenden células T CD4⁺ Th1 y CD8⁺ multifuncionales. Las respuestas inducidas de células T de IFN- γ se ampliaron en los convalecientes de COVID-19 y no se vieron afectadas por ninguna mutación de las variantes actuales de interés (VOC; B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2).

- 25 El término "péptido" se usa en la presente memoria para designar una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente entre 7 y 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente entre 8 y 19, y muy preferiblemente de 15 aminoácidos de longitud, pero pueden ser tan largos como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más.

- 30 Además, el término "péptido" incluirá sales de una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferiblemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, tales como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Debe observarse que las sales de los péptidos según la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado(s) *in vivo*, como los péptidos no son sales *in vivo*.

- 35 El término "péptido" también incluirá "oligopéptido". El término "oligopéptido" se utiliza en la presente memoria para designar una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crítica para la invención, siempre que el epítomo o epítomos correctos se mantengan en el mismo. Los oligopéptidos tienen típicamente menos de aproximadamente 30 restos de aminoácidos de longitud, y más de aproximadamente 10 o 15 aminoácidos de longitud.

- 40 El término "péptido" también incluirá "polipéptido". El término "polipéptido" designa una serie de restos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica para la invención siempre que se mantengan los epítomos correctos. En contraste con los términos péptido u oligopéptido, el término polipéptido se refiere a moléculas que contienen más de aproximadamente 30 restos de aminoácidos.

- 45 Por una "variante" de la secuencia de aminoácidos dada, los inventores se refieren a que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los restos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro resto de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de manera que el péptido todavía puede unirse a una molécula del MHC sustancialmente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10. Por ejemplo, un péptido puede modificarse de modo que al menos mantenga, si no mejora, la capacidad de interaccionar con y unirse al surco de unión de una molécula del MHC adecuada, tal como HLA-A*02, y de esa manera, al menos mantenga, si no mejora, la capacidad de unirse al TCR de las células T activadas.

- 50 Un experto en la materia podrá evaluar si las células T inducidas por una variante de un péptido específico podrán reaccionar de manera cruzada con el propio péptido (Appay et al., 2006; Colomberti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

- 55 Estas células T pueden reaccionar posteriormente de manera cruzada con células y eliminar células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín como se define en los aspectos de la invención. Como puede derivarse de la bibliografía científica y las bases de datos (Rammensee et al., 1999 *l.c.*; Godkin et al., 1997), determinadas posiciones de los péptidos de unión a HLA son típicamente restos de anclaje que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del receptor de HLA, que se define por propiedades polares,

- electrofísicas, hidrófobas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen el surco de unión. Por lo tanto, un experto en la técnica sería capaz de modificar las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 10 o las SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, manteniendo los restos de anclaje conocidos, y sería capaz de determinar si dichas variantes mantienen la capacidad de unirse a moléculas del MHC de clase I o II. Las variantes conservan la capacidad de unirse al TCR de las células T activadas, que posteriormente pueden reaccionar de manera cruzada con y eliminar las células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos naturales del péptido afín como se define en los aspectos de la invención.
- En la presente descripción, el término "homólogo" se refiere al grado de identidad entre secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias peptídicas o polipeptídicas. La "homología" mencionada anteriormente se determina comparando dos secuencias alineadas en condiciones óptimas sobre las secuencias que van a compararse. Dicha homología de secuencia puede calcularse creando un alineamiento usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW. El software de análisis de secuencias comúnmente disponible, más específicamente, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas se proporcionan mediante bases de datos públicas.
- "Porcentaje de identidad" o "porcentaje idéntico" a su vez, cuando se refiere a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de la alineación de la secuencia que se va a comparar (la "Secuencia Comparada") con la secuencia descrita o reivindicada (la "Secuencia de Referencia"). El porcentaje de identidad se determina después según la siguiente fórmula: porcentaje de identidad = $100 [1 - (C/R)]$, en donde C es el número de diferencias entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada a lo largo de la longitud de la alineación entre la Secuencia de Referencia y la Secuencia Comparada, en donde
- (i) cada base o aminoácido en la Secuencia de Referencia que no tiene una base o aminoácido alineado correspondiente en la Secuencia Comparada, y
 - (ii) cada hueco en la Secuencia de Referencia, y
 - (iii) cada base o aminoácido alineado en la Secuencia de Referencia que es diferente de una base o aminoácido alineado en la Secuencia Comparada, constituye una diferencia, y
 - (iiii) el alineamiento tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;
- y R es el número de bases o aminoácidos en la Secuencia de Referencia sobre la longitud de la alineación con la Secuencia Comparada con cualquier hueco creado en la Secuencia de Referencia que también se cuenta como una base o aminoácido.
- Si existe un alineación entre la Secuencia Comparada y la Secuencia de Referencia para la que el porcentaje de identidad como se calculó anteriormente es aproximadamente igual o mayor que un porcentaje de identidad mínimo especificado, entonces la Secuencia Comparada tiene el porcentaje de identidad mínimo especificado con la Secuencia de Referencia aunque incluso puedan existir alineaciones en donde el porcentaje de identidad calculado anteriormente en la presente memoria es menor que el porcentaje de identidad especificado.
- "Polipéptido de longitud completa" se refiere a las proteínas fuente a partir de las que se derivan los péptidos, por ejemplo, proteínas codificadas por SARS-CoV-2, tales como la poliproteína de 7096 aminoácidos (aa) de longitud ORF1ab (complejo de replicasa), la glicoproteína de superficie de 1273 aa de longitud (S por "espículas"; ORF2), la proteína de envoltura de 75 aa de longitud (E por "envoltura"; ORF 4), la glicoproteína de membrana de 222 aa de longitud (M por "membrana"; ORF5), la fosfoproteína de nucleocápside de 419 aa de longitud (N por "nucleocápside"; ORF9) y otras cinco proteínas (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 y ORF10).
- Dicho péptido descrito en la presente memoria tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase I o II, y en donde dicho péptido, cuando se une a dicho MHC, es capaz de ser reconocido por las células T CD4 y/o CD8.
- Esta medida tiene la ventaja de que se garantiza la capacidad del péptido según la invención para inducir una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta de las células T.
- En la presente memoria se describe un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende un tramo continuo de aminoácidos según una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10.
- Esta medida tiene la ventaja de que el péptido comprende todos los aminoácidos que se predice que están implicados en la inducción de una respuesta inmunitaria. La eficacia terapéutica se mejora aún más con la presente memoria. Un "tramo continuo" en este contexto significa que el péptido comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, sin ninguna interrupción por o inserción de otros componentes o aminoácidos, por ejemplo, AS₁-AS₂-AS₃-AS₄-AS₅-AS₆-AS₇-AS₈-AS₉-AS₁₀, o AS₃-AS₄-AS₇-AS₈-AS₉-AS₁₀, donde "AS" significa aminoácido, el número se refiere a la SEQ ID NO indicada y "-" representa una unión peptídica.

También se describe, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo, en particular un anticuerpo soluble o unido a membrana, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que reconoce específicamente el péptido o variante del mismo según la presente divulgación, preferiblemente cuando se une a una molécula del MHC.

5 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se usa en la presente memoria en un sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de moléculas de inmunoglobulina intactas o "completas", también están incluidos en el término "anticuerpos" fragmentos (por ejemplo, fragmentos de CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las moléculas de inmunoglobulina, siempre que muestren una cualquiera de las propiedades deseadas, es decir, reconozcan específicamente el péptido o variante del mismo según la presente divulgación. Siempre que sea posible, los anticuerpos pueden adquirirse de fuentes
10 comerciales. Los anticuerpos también pueden generarse usando métodos bien conocidos.

Las funciones, características y ventajas descritas para el péptido según la presente divulgación se aplican al anticuerpo y fragmento del mismo de manera correspondiente.

15 Otro objetivo de la divulgación, pero que no forma parte de la invención, se refiere a un receptor de células T preferiblemente soluble o unido a membrana, o un fragmento del mismo, que es reactivo con un ligando de HLA, en donde dicho ligando es el péptido o variante del mismo según la presente divulgación, preferiblemente cuando se une a una molécula del MHC.

20 El término "receptor de células T" (abreviado TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena polipeptídica alfa (cadena alfa) y una cadena polipeptídica beta (cadena beta), en donde el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un antígeno peptídico presentado por una molécula HLA. El término también incluye los denominados TCRs gamma/delta.

Las funciones, características y ventajas descritas para el péptido y anticuerpo o fragmento del mismo se aplican al receptor de células T de manera correspondiente.

25 Un objetivo adicional más de la presente divulgación pero que no es parte de la invención se refiere a un ácido nucleico, que codifica un péptido o variante del mismo según la presente divulgación, un anticuerpo o fragmento del mismo según la presente divulgación, un receptor de células T o fragmento del mismo según la presente divulgación, opcionalmente unido a una secuencia promotora heteróloga, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.

30 El ácido nucleico que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido particular puede ser natural o puede construirse sintéticamente. El ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) puede ser, por ejemplo, DNA, cDNA, PNA, RNA o combinaciones de los mismos, formas de polinucleótidos monocatenarias y/o bicatenarias, o nativas o estabilizadas, tales como, por ejemplo, polinucleótidos con una cadena principal de fosforotioato y puede o no contener intrones siempre que codifiquen el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contienen restos de aminoácidos de origen natural unidos por enlaces peptídicos de origen natural pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto
35 más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido según la invención. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico que codifica (o codificante) un péptido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido que incluye codones de inicio y parada artificiales (hechos por el hombre) compatibles con el sistema biológico en donde la secuencia debe expresarse, por ejemplo, mediante una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCRs. El término "promotor" significa una región de DNA implicada en la unión de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

40 Las funciones, características y ventajas descritas para el péptido se aplican al ácido nucleico y al vector de expresión de manera correspondiente.

45 Otro objetivo de la divulgación, pero que no forma parte de la invención, se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el péptido según la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo según la divulgación, el receptor de células T o fragmento del mismo según la divulgación o el ácido nucleico o el vector de expresión según la divulgación, donde dicha célula huésped se selecciona preferiblemente de una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica, una célula T o una célula NK.

Las funciones, características y ventajas descritas para el péptido según la presente divulgación se aplican a la célula huésped de manera correspondiente.

50 Un objetivo adicional más de la divulgación que no es parte de la invención se refiere a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el método poner en contacto *in vitro* células T con moléculas del MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o un constructo artificial que imita una célula presentadora de antígeno durante un período de tiempo suficiente para activar dichas células T de una manera específica de antígeno, en donde dicho antígeno es un péptido según la presente divulgación.

55

Las células T activadas que se dirigen contra los péptidos de la divulgación son útiles en terapia. Por lo tanto, un aspecto adicional de la divulgación proporciona células T activadas obtenibles mediante los métodos anteriores.

5 Las células T activadas, que se producen mediante el método anterior, reconocerán selectivamente una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende péptidos caracterizados por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y además opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

10 Una "composición farmacéutica" es una composición adecuada para la administración a un ser humano en un entorno médico. Preferiblemente, una composición farmacéutica es estéril y se produce según las directrices de GMP.

15 Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también anteriormente). Tal y como se usa en la presente memoria, "una sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los péptidos descritos en donde el péptido se modifica fabricando sales de ácido o base del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (típicamente en donde la forma neutra del fármaco tiene un grupo -NH₂ neutro) que implica la reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar las sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Por el contrario, la preparación de las sales básicas de restos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

25 Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención es un producto inmunoterapéutico tal como una vacuna. Puede administrarse directamente al paciente, preferiblemente por vía subcutánea (s.c.), por ejemplo, en el abdomen, o de otro modo de manera sistémica, i.d., i.m., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o una línea celular humana que se administran posteriormente al paciente, o se usan *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, que después se readministran al paciente. Si el ácido nucleico se administra a las células *in vitro*, puede ser útil para que las células se transfecten de modo que co-expresen citocinas inmunoestimulantes, tales como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinado con un adyuvante inmunoestimulante o usado en combinación con citocinas inmunoestimulantes, o puede administrarse con un sistema de administración adecuado, por ejemplo liposomas. El péptido también puede conjugarse con un vehículo adecuado tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o manano (véase el documento de Patente WO 95/18145 y Longenecker et al., 1993). El péptido según la invención también puede estar marcado, puede ser una proteína de fusión o puede ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se da en la presente invención estimulen las células T CD4 o CD8. Sin embargo, la estimulación de células T CD8 es más eficiente en presencia de la ayuda proporcionada por las células T auxiliares CD4. Por lo tanto, para epítopos del MHC de clase I que estimulan células T CD8, el compañero de fusión o secciones de una molécula híbrida proporcionan adecuadamente epítopos que estimulan células T CD4 positivas. Los epítopos estimulantes de CD4- y CD8- son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

40 En un aspecto, la vacuna comprende al menos péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, y al menos un péptido adicional, preferiblemente de dos a 50, más preferiblemente de dos a 25, incluso más preferiblemente de dos a 20 y lo más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. El péptido(s) puede derivarse de uno o más TAAs específicos y puede unirse a moléculas del MHC de clase I.

45 La composición farmacéutica según la invención comprende al menos 6, preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 10 péptidos diferentes, comprendiendo cada péptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9, y 10, y secuencias variantes de las mismas que son homólogas en al menos un 88% a SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9, y 10, y en donde dicha variante se une a molécula(s) del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y/o induce la reacción cruzada de células T con dicho péptido variante; y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde dicho péptido no es un polipéptido de longitud completa.

50 Los inventores han observado que una composición farmacéutica, tal como una vacuna, tiene un buen efecto inmunogénico si están contenidos en la misma al menos 5 péptidos o secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10. Cuando se usan de 8 o 10 péptidos o secuencias de aminoácidos, se puede cubrir el 91,7% de la población del mundo humano.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica, que es preferiblemente una vacuna, comprende péptidos caracterizados por las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1-4, 7-9 y 10:

KDGIHWATEGALNT (SEQ ID NO: 1)
 RWYFYYLGTGPEAGL (SEQ ID NO: 2)
 ASWFTALTQHGKEDL (SEQ ID NO: 3)
 LLLLDRLNQLSKMS (SEQ ID NO: 4)
 ITRFQTLALHRSYL (SEQ ID NO: 7)
 LSYYKLGASQRVAGD (SEQ ID NO: 8)
 FYVYSRVKLNSSRV (SEQ ID NO: 9)
 SKWYIRVGARKSAPL (SEQ ID NO: 10).

Dicha vacuna ha resultado proporcionar una protección particularmente eficaz.

- 5 En la invención, la composición farmacéutica, que es preferiblemente una vacuna, comprende péptidos caracterizados por las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10:

ASWFTALTQHGKEDL (SEQ ID NO: 3) :
 LLLLDRLNQLSKMS (SEQ ID NO: 4)
 ITRFQTLALHRSYL (SEQ ID NO: 7)
 LSYYKLGASQRVAGD (SEQ ID NO: 8)
 FYVYSRVKLNSSRV (SEQ ID NO: 9)
 SKWYIRVGARKSAPL (SEQ ID NO: 10).

- 10 Los inventores han descubierto que la omisión de péptidos que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6 da como resultado un aumento significativo de la solubilidad de la mezcla de péptidos. Además, reduce los costes de producción de la vacuna final. También reduce los riesgos de cualquier efecto secundario.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante.

- 15 Aunque las vacunas peptídicas son una estrategia atractiva para inducir respuestas inmunitarias altamente dirigidas, evitando en consecuencia secuencias alergénicas y/o reactogénicas, a menudo son débilmente inmunogénicas y necesitan vehículos particulados para su administración y conjugación. Por lo tanto, además de la selección de dianas peptídicas óptimas, se prefiere el uso de un adyuvante adecuado, que sea capaz de inducir respuestas inmunitarias fuertes y de larga duración. Según la invención, se toma en consideración cualquier tipo de adyuvante inmunogénico adecuado, tal como emulsiones de agua en aceite, sales de aluminio, adyuvante completo de Freund, escualeno, QS21, lípido A, etc.

- 20 En una realización de la composición farmacéutica, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en ligando de TLR1/2, el ligando XS15 de TLR1/2, el ligando Pam3Cys de TLR1/2, ligando de TLR9, el ligando CpG de TLR9, Montanide ISA 51 VG, y combinaciones de los mismos.

- 25 Esta medida tiene la ventaja de que se proporcionan adyuvantes especialmente eficaces. Entre los métodos de vacunación con los péptidos más eficaces ensayados en seres humanos está la inyección subcutánea de péptidos emulsionados en Montanide ISA 51 VG, una emulsión de agua en aceite, combinada con el ligando CpG de TLR9. El nuevo ligando XS15 de TLR1/2 emulsionado en Montanide ISA 51 VG también puede emplearse como adyuvante. XS15 es un derivado soluble en agua del ligando Pam3Cys de TLR1/2 que induce una respuesta fuerte de las células T CD8⁺ y CD4⁺ Th1 contra péptidos cortos libres en Montanide ISA 51 VG después de una única inyección s.c. en voluntarios sanos así como en pacientes.

- 30 El régimen de dosificación apropiado de la preparación farmacéutica según la invención se establecerá por el experto en la técnica mediante estudios de determinación de dosis teniendo en cuenta diversos factores tales como la edad, el sexo y la historia médica del paciente, la gravedad de la enfermedad esperada, etc. Normalmente, pueden usarse dosis peptídicas que varían de 10 a 5000 µg por vacunación. Preferiblemente, se usan dosis peptídicas que varían de 300-500 µg por vacunación que inducen fuertes respuestas inmunitarias. En una realización de la invención, la dosis preferida para un péptido está en el intervalo entre 100 y 500 µg con una fuerte preferencia al intervalo superior. La dosis de ~240 µg por péptido por dosis para una vacuna según la invención se prefiere en otra realización de la composición farmacéutica. Con esta dosis se pudo mostrar la inducción de una fuerte respuesta de células T para los péptidos incluidos en la vacuna en combinación con XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG. En una realización de la invención, la composición farmacéutica se proporciona en una forma de dosificación donde el péptido está contenido en la cantidad como se indica en este párrafo. Esta medida tiene la ventaja de que se proporciona una
 40 vacuna lista para usar.

Otro objetivo de la divulgación, pero que no forma parte de la invención, se refiere al péptido, el anticuerpo o fragmento del mismo, al receptor de células T o fragmento del mismo, al ácido nucleico o al vector de expresión, a la célula huésped recombinante o al linfocito T activado según la divulgación para su uso en medicina, preferiblemente para su uso contra una infección por SARS-CoV-2 (COVID-19), tal como una vacuna.

5 Un objetivo adicional más de la presente divulgación, pero que no es parte de la invención, se refiere a un kit que comprende:

(a) un recipiente que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido(s) o la variante, el anticuerpo o fragmento del mismo, el receptor de células T o fragmento del mismo, el ácido nucleico o el vector de expresión, la célula huésped recombinante o el linfocito T activado según la presente divulgación, en solución o en forma liofilizada;

10 (b) opcionalmente, un segundo recipiente que contiene un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada;

(c) opcionalmente, al menos un péptido más seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10, y

15 (d) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada.

El kit puede comprender además uno o más de (iii) un tampón, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, o (v) una jeringa. El recipiente es preferiblemente una botella, un vial, una jeringa o tubo de ensayo; y puede ser un recipiente multiuso. La composición farmacéutica está preferiblemente liofilizada.

20 Los kits de la presente divulgación comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un recipiente adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Preferiblemente, el kit y/o recipiente contiene instrucciones sobre o asociadas con el recipiente que indican instrucciones para la reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el marcador puede indicar que la formulación liofilizada se va a reconstituir a concentraciones peptídicas como se ha descrito anteriormente. El marcador puede indicar además que la formulación es útil o está destinada para la administración subcutánea.

25 Se debe entender que las características mencionadas anteriormente y las que se mencionarán a continuación no solo se pueden usar en la combinación indicada en el caso respectivo, sino también en otras combinaciones o de manera aislada.

30 La invención se describe y explica ahora con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitantes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Predicción de epítomos de células T CD4⁺ derivados de SARS-CoV-2. (A) Cobertura de la población de HLA-DR alcanzada con la selección de alotipos de los inventores en comparación con la población mundial. Las frecuencias de individuos dentro de la población mundial que portan hasta seis alotipos de HLA (eje x) se indican como barras grises en el eje y izquierdo. El porcentaje acumulativo de cobertura de población se representa como puntos negros en el eje y derecho. (B) Distribución de péptidos restringidos por HLA derivados de los distintos ORFs a los diferentes alotipos de HLA-DR. (C-K) Distribución de péptidos de unión a HLA-DR dentro de las diferentes proteínas de ORF. Cada color representa un alotipo de HLA de clase I distinto. (L) Cobertura proteica de los péptidos HLA-DR predichos para las diferentes proteínas de ORF. La barra discontinua indicó el porcentaje de cobertura de un ORF distinto dentro del proteoma completo de SARS-CoV-2.

Figura 2: Respuestas de células T CD4⁺ contra péptidos de CoVac-1 en pacientes después de la recuperación de la infección por SARS-CoV-2. (A) Ejemplo de ensayos ELISPOT después de 12 días de amplificación de células T usando KDGIWVATEGALNT (P01; SEQ ID NO 1), RWYFYLLGTGPEAGL (P03; SEQ ID NO 2), LLLLDRLNQLESKMS (P07; SEQ ID NO 4) en PBMC de pacientes recuperados del péptido DR del VIH con infección por SARS-CoV-2 sirvió como control negativo. (B) Tinción de citocinas intracelulares (ICS) de células T CD4⁺ que usan los péptidos de CoVac-1 KDGIWVATEGALNT (P01; SEQ ID NO: 1), ASWFTALTQHGKEDL (P04; SEQ ID NO: 3), LLLLDRLNQLESKMS (P07; SEQ ID NO: 4). Los gráficos muestran células CD4⁺ viables individuales teñidas para IFN, TNF y CD107 analizadas mediante citometría de flujo.

50 Figura 3: Resultados de inmunomonitorización basados en ELISpot de IFN- γ en un paciente con carcinoma de colon. Se realizó inmunomonitorización antes y después de la administración s.c. de una vacuna peptídica personalizada que contenía XS15 emulgado en Montanide. Se muestra la funcionalidad (producción de IFN- γ) de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del péptido para dos péptidos contenidos en la vacuna administrada. Se realizaron un total de tres vacunaciones.

Figura 4: Respuestas inducidas de células T en los 12 sujetos del ensayo de P-pVAC-SARS-CoV-2 evaluado mediante ELISPOT *ex vivo*. La inducción (marcada en verde) de la respuesta de células T específicas de péptido a V2 (d7), V3 (d14, V4 (d28), medida mediante ELISPOT de IFN- γ *ex vivo* se define como el ensayo positivo (el recuento medio de manchas por pocillo es al menos 3 veces mayor que el número medio de manchas en los pocillos de control negativo) y el recuento de manchas es al menos 2 veces mayor que el ensayo de referencia (V1).

Figura 5: Respuestas de células T ejemplares contra péptidos CoVac-1 en un sujeto después de la vacunación. Ejemplo ensayos ELISPOT de IFN- γ *ex vivo* usando los seis péptidos incluidos en la vacuna de CoVac-1 en PBMC de un sujeto (1-11) vacunado dentro del ensayo de fase I. El péptido DR del VIH sirvió como control negativo, PHA como control positivo.

Figura 6: Frecuencia de células T específicas de SARS-CoV-2 funcionales. Frecuencia de células T funcionales (IFN- γ ⁺, TNF⁺, IL-2⁺) específicas de SARS-CoV-2 después de una única vacunación con CoVAC-1 (vacuna de 6 péptidos) en d28 y en d1 antes de la vacunación como se evaluó mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS) basada en citometría de flujo. Los datos se muestran para sujetos positivos. La frecuencia de las células T funcionales de SARS-CoV-2 se indica como % de células positivas para citocinas menos el control negativo respectivo.

Figura 7: Respuestas de células T CD8⁺ específicas de SARS-CoV-2 inducidas por CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos). Ejemplo representativo (pCoV-18) de la respuesta de células T CD8⁺ específicas de SARS-CoV-2 inducida por CoVac-1 contra epítomos de células T de HLA de clase I embebidos como se evaluaron mediante ELISPOT de IFN- γ el día 14 y el día 28 después de una única vacunación con CoVac-1 (panel izquierdo) y la tinción del tetrámero basada en citometría de flujo (panel derecho).

Figura 8: Frecuencia de células T CD4⁺ positivas a citocina. Los datos se analizaron el día 29 (PBNT162B1/Pfizer y mRNA-1273/Moderna, datos publicados) y 28 (CoVac-1) después de la vacunación con 2 dosis de PBNT162B1/Pfizer y 1 dosis de mRNA-1273/MODERNA y CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos). Los datos se muestran como la media de las células T positivas a citocinas, según se evalúa mediante tinción intracelular de citocinas. La frecuencia de las células T funcionales de SARS-CoV-2 se indica como % de células positivas a citocinas menos el control negativo respectivo.

Figura 9: Intensidad de las respuestas de células T de SARS-CoV-2 inducidas por vacunas. Datos de ELISPOT de INF- γ el día 29 después de la vacunación con ChAgOx1 (AstraZeneca, datos publicados) y el día 28 después de la vacunación con CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) (análisis de inmunogenicidad provisional P-pVAC-SARS-CoV-2). Los datos se muestran como la media de las unidades de formación de manchas por 1×10^6 células menos la media del control negativo respectivo. Los análisis se realizaron después de la estimulación de PBMCs con conjuntos de péptidos que representan los antígenos de vacuna respectivos.

Figura 10: Comparación directa de las respuestas de células T a epítomos de células T de CoVac-1 entre sujetos vacunados con CoVac-1- (6 péptidos vacuna) y BNT162b2. Los análisis de ELISPOT de INF- γ se realizaron *ex vivo* para PBMCs de HV de media 25 días después de la segunda vacunación con BNT162b2 y sujetos de estudio vacunados con CoVac-1 el día 28 después de la vacunación. Se estimularon PMCS con los seis epítomos de células T incluidos en la vacuna CoVac-1. Las respuestas de las células T se consideraron positivas cuando el recuento medio de manchas fue 3 veces mayor que el recuento medio de manchas del control negativo. La intensidad de las respuestas de células T se representa como recuentos de manchas, que representan el recuento de manchas medio de triplicados normalizados a 5×10^6 células menos el recuento medio normalizado de manchas del control negativo respectivo. Los datos se muestran como la media con SEM.

Figura 11: Papel de las variantes de interés (VOC) de SARS-CoV-2 sobre los péptidos de CoVac-1 y la inmunogenicidad. Las mutaciones codificadas por color descritas para VOC se muestran junto con los péptidos de CoVac-1 afectados correspondientes (Panel A). Las intensidades (recuentos de manchas calculados) de las respuestas de células T a péptidos de CoVac 1, así como a los correspondientes conjuntos de péptidos que comprenden las mutaciones que afectan a CoVac-1 de B.1.1.7 y B.1.351 se evaluaron *ex vivo* mediante ensayos ELISPOT de IFN- γ usando PBMCs de participantes del estudio recogidos el día 28 después de la administración de la vacuna (pCOVs, Panel B) o de convalecientes humanos (HCs, Panel C).

EJEMPLOS

1. Estudios no clínicos

1.1 Visión general

En las siguientes secciones, se explica la selección de los péptidos derivados de SARS-CoV-2 como base para una realización de la vacuna según la invención (a continuación: vacuna CoVac-1). Además, se describirán todos los datos preclínicos para el nuevo agonista XS15 de TLR1/2 incluido como un lipopéptido en la mezcla de péptidos para el producto farmacológico (DP) de CoVac-1. El valor predictivo de modelos animales para el ensayo no clínico de vacunas de CoVac-1 es limitado, ya que la interacción entre moléculas HLA, péptidos y células T es altamente específica de especies y alelos. Por lo tanto, la sección no clínica que describe los péptidos derivados de SARS-CoV-2 para el DP de CoVac-1 contiene numerosos datos *in vitro* y *ex vivo*.

1.2 Selección de péptidos HLA-DR derivados de SARS-CoV-2

Razonamiento para la selección de péptidos derivados de HLA de clase II

Múltiples estudios en modelos animales han demostrado claramente el requisito de la ayuda de células T CD4⁺ a la generación de respuestas protectoras de anticuerpos (por ejemplo, gripe, malaria, vaccinia). Estudios recientes también han demostrado que el papel de las células T CD4⁺ en la respuesta inmunitaria a infecciones víricas no se limita a ayudar a la producción de anticuerpos; las células T CD4⁺ también se necesitan para generar respuestas óptimas de células T CD8⁺. Además, las células T CD4⁺ pueden actuar adicionalmente como células efectoras mediante la secreción de citocinas y la eliminación directa de las células infectadas. Los antígenos de HLA de clase II activan específicamente las células T CD4⁺ auxiliares, por lo tanto, una vacuna basada en péptidos de HLA de clase II derivados de SARS-CoV-2, permitirá una potente respuesta inmunitaria celular y humoral a SARS-CoV-2 evitando cursos graves de COVID-19. Por lo tanto, el DP de CoVac-1 estaba compuesto por diez péptidos HLA-DR derivados de SARS-CoV-2.

Predicción de péptidos derivados de SARS-CoV-2

Para la predicción de epítomos de células T derivados de SARS-CoV-2 potenciales, los inventores recuperaron la secuencia de proteoma representativa completa altamente conservada y anotada del aislado Wuhan-Hu-1 de SARS-CoV-2 que contenía diez marcos de lectura abiertos (ORFs) diferentes; véase Wu et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020; 579 (7798):265-269. La secuencia de aminoácidos de esta secuencia es completamente idéntica a la secuencia de referencia (EPI_ISL_412026) definida por Wang et al. realizando múltiples alineaciones de secuencias y análisis filogenéticos de 95 secuencias genómicas de longitud completa; véase Wang et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. Journal of Medical Virology. 2020.

Usando el algoritmo SYFPEITHI (Rammensee et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999; 50(3-4):213-219) los inventores predijeron los péptidos de HLA de clase II derivados de SARS-CoV-2 para los seis alotipos de HLA-DR más comunes (HLA-DRB1*01:01, -DRB1*03:01, DRB1*04:01, -DRB1*07:01, -DRB1*11:01 y -DRB1*15:01) que cubren más del 70,0% de la población mundial con al menos un alotipo (Figura 1). Como los otros dos loci de HLA de clase II (DQ y DP) con oportunidades de unión adicionales para péptidos HLA de clase II de CoVac-1 no se han incluido en el análisis, la promiscuidad real de los péptidos elegidos es probablemente incluso mayor. La unión de los péptidos HLA de clase II de depósito a diversas moléculas HLA de clase II diferentes (unión promiscua) es importante para garantizar que la mayoría de los pacientes tratados con péptidos de depósito pueden beneficiarse de una respuesta de células T auxiliares de apoyo. Para las predicciones de HLA de clase II, todos los diez ORFs se dividieron en péptidos de 15 aminoácidos de longitud, dando como resultado 9561 péptidos de 15 unidades de longitud en total. Los péptidos de puntuación superior al 5% de cada ORF (en relación con la longitud total de cada ORF, 2% para ORF1) se seleccionaron y clasificaron según su posición dentro de la proteína. Para permitir una amplia aplicabilidad, los inventores seleccionaron grupos de variantes de longitud peptídica con altas puntuaciones de predicción para diversos alelos de HLA-DR (Figura 1). De cada agrupamiento seleccionado se produjo un péptido representativo como péptido sintético para análisis de inmunogenicidad, evitando así péptidos que contienen cisteínas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: péptidos derivados de SARS-CoV-2 incluidos en vacunas de CoVac-1 ('vacuna de 10 péptidos)

secuencia	SEQ ID NO	Restricción de HLA	longitud del péptido	posición	proteína	nombre de la proteína	clase de proteína
KDGIWVATEGALNT	1	DR	15	127-141	ORF9	proteína de la nucleocápside	Estructural
RWYFYLLGTGPEAGL	2	DR	15	107-121	ORF9	proteína de la nucleocápside	Estructural
ASWFTALTQHGKEDL	3	DR	15	50-64	ORF9	proteína de la nucleocápside	estructural
LLLLDRLNQLESKMS	4	DR	15	221-235	ORF9	proteína de la nucleocápside	estructural
ASAFFGMSRIGMEVT	5	DR	15	311-325	ORF9	proteína de la nucleocápside	estructural

VADYSVLYNSASFST	6	DR	15	362-376	ORF2	proteína de la espícula	estructural
ITRFQTLALHRSYL	7	DR	15	235-249	ORF9	proteína de la espícula	estructural
LSYYKLGASQRVAGD	8	DR	15	176-190	ORF5	proteína de membrana	estructural
FVYYSRVKLNLSRV	9	DR	15	56-70	ORF4	proteína de membrana	estructural
SKWYIRVGARKSAPL	10	DR	15	43-57	ORF8	n.a.	no estructural

Tabla 2: Péptidos derivados de SARS-CoV-2 incluidos en vacunas de CoVac-1 ('vacuna de 6 péptidos')

Secuencia	SEQ ID NO	Restricción de HLA	longitud del péptido	posición	proteína	nombre de la proteína	clase de proteína
ASWFTALTQHGKEDL	3	DR	15	50-64	ORF9	proteína de la nucleocápside	estructural
LLLLDRLNQLESKMS	4	DR	15	221-235	ORF9	proteína de la nucleocápside	estructural
ITRFQTLALHRSYL	7	DR	15	235-249	ORF9	proteína de la espícula	estructural
LSYYKLGASQRVAGD	8	DR	15	176-190	ORF5	proteína de membrana	estructural
FVYYSRVKLNLSRV	9	DR	15	56-70	ORF4	proteína de membrana	estructural
SKWYIRVGARKSAPL	10	DR	15	43-57	ORF8	n.a.	no estructural

5 **Immunogenicidad y papel en el curso natural de la infección por SARS-CoV-2 de péptidos derivados de SARS-CoV-2**

Para ejercer actividad antiviral, los péptidos contenidos en el depósito deben (i) procesarse y presentarse naturalmente en el curso de la infección por SARS-CoV-2 y (ii) inducir respuestas inmunitarias específicas *in vivo*. Para evaluar estos puntos, los inventores seleccionaron una cohorte de pacientes recuperados de la infección por SARS-CoV-2 para respuestas de células T contra los péptidos de HLA de clase II derivados de SARS-CoV-2 predichos. Las respuestas de células T específicas de péptido inducidas naturalmente se evaluaron usando ELISPOT de IFN- γ y tinción de citocinas intracelulares basada en citometría de flujo. Aquellos péptidos con la frecuencia más alta (hasta 95%) de respuestas de células T dentro de la infección natural por SARS-CoV-2 se seleccionaron para la vacuna de CoVac-1 (Tabla 3). Las células T de SARS-CoV-2 inducidas naturalmente que detectan péptidos de CoVac-1 se caracterizaron adicionalmente por tinción de citocinas intracelulares. La mayoría de las células T eran células CD4⁺ Th1 multifuncionales que producen TNF e IFN- γ , así como la regulación positiva del marcador de citotoxicidad CD107. Además, los inventores seleccionaron una gran cohorte de donantes nunca expuestos a SARS-CoV-2 (muestras afirmadas antes de 6/2019) para respuestas de células T de memoria contra los péptidos de CoVac-1. Para 8/10 de los péptidos HLA-DR derivados de SARS-CoV-2 seleccionados para la vacuna de CoVac-1 se detectaron respuestas de células T en hasta un 44% de los donantes no expuestos. Esto es debido muy probablemente a la

5 reactividad cruzada de las células T basada en la homología de secuencia de SARS-CoV-2 con los virus corona fríos comunes u otros patógenos. Esta reactividad cruzada es un efecto bien conocido que ocurre frecuentemente en la inmunidad de células T víricas y de otros patógenos que proporciona la llamada inmunidad heteróloga. La inmunidad heteróloga se define como una inmunidad que puede desarrollarse a un patógeno después de la exposición o vacunación a patógenos no idénticos. Por lo tanto, la vacuna de CoVac-1 no solo inducirá respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 de novo sino que además permitirá expandir poblaciones de células T de detección de SARS-CoV-2 poco frecuentes que preexisten en voluntarios/pacientes de estudio.

A modo de ejemplo, los resultados de un ELISPOT de IFN- γ y tinción de citocinas intracelulares basada en citometría de flujo que detectan respuestas de células T CD4⁺ inducidas de manera natural se muestran en la Figura 2.

Tabla 3: Respuestas de células T inducidas naturalmente a péptidos de CoVac-1 en ELISPOT de IFN- γ e ICS en pacientes recuperados de infección por SARS-CoV-2 y donantes no expuestos

Secuencia	SEQ ID NO	Proteína	clase de proteína	Posición de inicio	Cohorte de SRAS		Cohorte de PRE	
					pos/ensayo	frecuencia [%]	pos/ensayo	frecuencia [%]
KDGIWVATEGALNT	1	ORF9	proteína de la nucleocápside	127	20/22	91%	8/18	44%
RWYFYLLGTGPEAGL	2	ORF9	proteína de la nucleocápside	107	16/22	73%	1/18	6%
ASWFTALTQHGKEDL	3	ORF9	proteína de la nucleocápside	50	13/22	59%	1/18	6%
LLLLDLRLNQLSKMS	4	ORF9	proteína de la nucleocápside	221	14/22	64%	1/17	6%
ASAFFGMSRIGMEVT	5	ORF9	proteína de la nucleocápside	311	12/23	52%	1/18	6%
VADYSVLYNSASFST	6	ORF2	proteína de la espícula	362		n.t.		

Inducción de las respuestas de células T CD4⁺ específicas del péptido en un voluntario sano mediante vacunación peptídica

ITRFQTLALHRSYL	7	ORF2	proteína de la espícula	estructural	235	12/22	55%	IFN- γ ⁺ TNF ⁺ CD107a ⁺	1/20	5%
FYVYSRVKLNSSRV	9	ORF4	proteína de envoltura	estructural	56	11/22	50%	IFN- γ ⁺ TNF ⁺	2/19	11%
LSYYKLGASQRVAGD	8	ORF5	proteína de membrana	estructural	176	21/22	95%	10x IFN- γ ⁺ TNF ⁺ 5x CD107a ⁺	0/19	0%
SKWYIRVGARKSAPL	10	ORF8	n.a.	accesorio	43	15/22	68%	5x IFN- γ ⁺ TNF ⁺	4/16	25%

Representación de péptidos derivados de SARS-CoV-2 en otras especies

En contraste con los auto-péptidos usados para la vacunación con péptidos en malignidades que pueden expresarse a niveles considerables también en péptidos derivados de virus de órganos normales no tienen el riesgo de inducir autoinmunidad. Esto está apoyado por los resultados de blast de las secuencias peptídicas de la vacuna de CoVac-1 usando "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" de la base de datos de uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>) que no muestran similitudes en la secuencia de ninguno de los péptidos con ninguna proteína/péptido humano. Las similitudes de secuencia más comunes se identificaron con SARS-CoV-1 así como con coronavirus de tipo Bat SARS (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados de la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST)" de la base de datos de uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>) para similitudes de secuencia del péptido CoVac-1

Secuencia	SEQ ID NO	Organismo	Nombre de la proteína	ID de la Proteína de Uniprot	Identidad [%]	Estado
KDGIWVATEGALNT	1	Bat coronavirus BM48-31/BGR/	Nucleoproteína	EOXJ00	93.3	no revisado
RWYFYLLGTGPEAGL	2	Coronavirus del SARS humano	Nucleoproteína	P59595	93.3	revisado
ASWFTALTQHGKEDL	3	Coronavirus del SARS humano	Nucleoproteína	P59595	93.3	revisado
LLLLDRLNQLESKMS	4	Coronavirus del SARS humano	Nucleoproteína	P59595	93.3	revisado
ASAFFGMSRIGMEVT	5	Coronavirus del SARS humano	Nucleoproteína	P59595	100.0	revisado
VADYSVLYNSASFST	6	Bat coronavirus HKU3	Glicoproteína de la espícula	Q3LZX1	86.7	revisado
ITRFQTLALHRSYL	7	Gluconobacter wancherniae NB, Leptospira gomenensis	Enzima bifuncional lspD/lspF, proteína de la familia de la insulina	A0A511AZ17, A0A5F1Z381	90	no visto
FYVYSRVKLNSSRV	9	Coronavirus del SARS humano	Proteína de membrana pequeña de la envoltura	P59637	100	revisado
LSYYKLGASQRVAGD	8	Coronavirus de tipo Bat SARS	Proteína de membrana	A0A2R3SUX3	100	no revisado
SKWYIRVGARKSAPL	10	Fasciola hepática	Receptor de rianodina 44F	A0A4E0RMD6	50.0	no revisado

Péptidos de depósito de unión a HLA de clase I embebidos

Los péptidos de vacuna 6/10 (Tabla 1) o 4/6 (Tabla 2) en la vacuna de CoVac-1 incluyen epítomos de células T CD8+ embebidos predichos para unirse a varios alotipos de HLA de clase I diferentes. Estos péptidos HLA de clase I embebidos permitirán activar adicionalmente las células T CD8+ que también deberían contribuir a prevenir cursos graves de la enfermedad de COVID-19. Los epítomos de células T CD8+ embebidos se basan en el trabajo preclínico de los inventores que predice y caracteriza los epítomos de células T de HLA de clase I derivados de SARS-CoV-2. Por lo tanto, las secuencias de proteínas de todos los diez ORFs de SARS-CoV-2 se dividieron en péptidos de 9 - 12 aminoácidos de longitud que cubrían el proteoma completo del virus. Los algoritmos de predicción NetMHCpan 4.0 y SYFPEITHI 1.0 (Rammensee et al. 1999, *l.c*) se usaron para predecir la unión de los péptidos a HLA-A*01:01, -

5 A*02:01, -A*03:01, -A*11:01, -A*24:02, -B*07:02, -B*08:01, -B*15:01, -B*40:01 y -C*07:02. Con esta selección de alotipos el 91,7% de la población mundial se cubre con al menos un alotipo de HLA. De la cantidad total de 38424 péptidos de 9-12 unidades de longitud posibles derivados de todos los 10 ORFs 1739 péptidos únicos de unión a HLA excluyendo péptidos que contienen cisteína se predijeron como epítomos potenciales de SARS-CoV-2; Nelde et al. (l.c.). La Tabla 5 muestra los epítomos de células T CD8⁺ embebidos para cada péptido de CoVac-1.

Tabla 5: Epítomos de células T de HLA de clase I embebidos en los péptidos de vacuna de CoVac-1

Secuencia	SEQ ID NO	Restricción de HLA	Péptidos de HLA de clase I embebidos
KDGIWVATEGALNT	1	DRB1*01, DRB1*04, DRB1*11	ninguno
RWYFYLLGTGPEAGL	2	DRB1*04	<u>YYLGTGPEAGL (A*24) (SEQ ID NO: 11)</u> <u>YLGTTGPEAGL (A*02) (SEQ ID NO: 12)</u>
ASWFTALTQHGKEDL	3	DRB1*04, DRB1*11	<u>FTALTQHGK (A*03, A*11) (SEQ ID NO: 13)</u>
LLLLDRLNQLSKMS	4	DRB1*04, DRB1*15	<u>LLLLDRLNQL (A*02) (SEQ ID NO: 14)</u> <u>LLLLDRLNQL (A*02) (SEQ ID NO: 15)</u>
ASAFFGMSRIGMEVT	5	DRB1*01, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11	<u>ASAFFGMSR (A*11) (SEQ ID NO: 16)</u>
VADYSVLYNSASFST	6	DRB1*01, DRB1*04, DRB1*11	ninguno
ITRFQTLALHRSYL	7	DRB1*01	<u>TRFQTLAL (C*07) (SEQ ID NO: 17)</u> <u>TLLAHSY (B*15) (SEQ ID NO: 18)</u> <u>LLALHRSYL (A*02) (SEQ ID NO: 19)</u>
FYVYSRVKLNSSRV	9	DRB1*04, DRB1*11	<u>FYVYSRVKLN (A*24) (SEQ ID NO: 20)</u> <u>RVKLNSSR (A*03) (SEQ ID NO: 21)</u>
LSYYKLGASQRVAGD	8	DRB1*04, DRB1*07	ninguno
SKWYIRVGARKSAPL	10	DRB1*01, DRB1*11	ninguno

Análisis de la estructura 3D de péptidos derivados de SARS-CoV-2

10 El desarrollo de anticuerpos de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) se ha identificado como un riesgo potencial para pacientes infectados después de enfoques de vacunación; véase Graham BS. Rapid COVID-19 vaccine development. Science. 2020. En contraste con otras vacunas clásicas que tienen como objetivo inducir una respuesta de anticuerpos para prevenir infecciones virales, la vacuna de CoVac-1 se diseña para inducir las células T específicas de SARS-CoV-2. Para minimizar aún más el riesgo de desarrollo de anticuerpos ADE para los péptidos de la vacuna de CoVac-1, especialmente para péptidos de las proteínas de la superficie del virus, solo se seleccionaron secuencias de 15 que no representan epítomos de anticuerpos, ya que no son accesibles a los anticuerpos debido a la estructura 3D predicha de la proteína o en base a su ubicación intravirión (Tabla 6). En una primera aplicación *in vivo* de un péptido de vacuna de CoVac-1 a partir de la proteína de la espícula (VADYSVLYNSASFST; SEQ ID NO: 6) en un voluntario sano no se observó inducción de anticuerpos hasta ahora. Por lo tanto, en comparación con otros enfoques de vacunas, el riesgo de inducción de anticuerpos ADE por la vacuna CoVac-1 es mínimo.

20

Tabla 6: Resultados del análisis estructural 3D de péptidos de CoVac-1 derivados de proteínas de superficie del virus

Secuencia	SEQ ID NO	Proteína	Proteína	clase de proteína	exposición a anticuerpos	
					estado cerrado	estado abierto
VADYSVLYNSASFST	6	ORF2	proteína de la espícula	estructural	susceptible de ser enterrada	expuesto en una hendidura
ITRFQTLALHRSYL	7	ORF2	proteína de la espícula	estructural	RSYL no resuelto, la mayoría están enterradas (SEQ ID NO: 22)	ALHRSYL no resuelto, la mayoría están enterradas (SEQ ID NO: 23)
FYVYSRVKLNLSRV	9	ORF4	proteína de envoltura	estructural	posición intravirión	
LSYYKLGASQRVAGD	8	ORF5	proteína de membrana	estructural	posición intravirión	

Comparación de CoVac-1 con vacunas de SARS-CoV-2 aprobadas (BNT126b2, Biontech SE; mRNA-12738, Moderna, Inc.; ChAdOx1, AstraZeneca)

- 5 A diferencia de los candidatos de vacuna aprobados, la vacuna de CoVac-1 basada en péptidos incluye epítomos validados de células T de SARS-CoV-2 que se probó que (i) se detectaban frecuentemente en convalecientes después de la infección natural por SARS-CoV-2, (ii) eran de relevancia patofisiológica para la inmunidad de las células T para combatir COVID-19 y (iii) mediaban en la inmunidad a largo plazo después de la infección. Por lo tanto, se espera que CoVac-1 induzca una inmunidad de células T de SARS-CoV-2 fuerte y de larga duración que sea comparable a la
- 10 inmunidad de las células T después de la infección natural. Además, y también a diferencia de los candidatos de vacuna aprobados que inducen respuestas inmunitarias limitadas a la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, CoVac-1 induce una inmunidad amplia de las células T que se dirige a múltiples proteínas víricas (por ejemplo, espícula, nucleocápsida, membrana, envoltura, etc.). Esto es de particular importancia a la luz de mutaciones emergentes que estimulan la eficacia de las vacunas actuales.

15 **2. Estudios clínicos**

Compendio

Definición de términos

Sustancias farmacológicas:	Diez péptidos HLA-DR derivados de SARS-CoV-2 y el ligando XS15 de TLR1/2
Mezcla de péptidos:	Mezcla de péptidos para cada voluntario/paciente de estudio que incluye 10 (Tabla 1) o 6 (Tabla 2) péptidos inmunogénicos derivados de SARS-CoV-2 de HLA-DR y el ligando XS15 de TLR1/2
IMP/Producto Farmacológico/vacuna peptídica:	CoVac-1: Mezcla de péptidos emulsionada en Montanide ISA 51 VG
Administración de IMP:	Inyección subcutánea con una jeringa de 2 ml (por ejemplo, BD Emerald) y una aguja (por ejemplo, BD Eclipse Needle 27Gx1/2)

2.1 Péptidos derivados de SARS-CoV-2

Cada voluntario/paciente inscrito en los ensayos P/T-pVAC-SARS-CoV-2 recibe 10 (Tabla 1) o 6 (Tabla 2) péptidos heterogéneos de HLA-DR (240 µg cada uno) derivados de diferentes proteínas de SARS-CoV-2 junto con el ligando XS15 de TLR1/2. Para la aplicación, la mezcla de vacunas se emulsiona en Montanide ISA 51 VG. Los detalles sobre las sustancias farmacológicas se pueden encontrar en las Tablas 1 (10 vacunas peptídicas) y 2 (6 vacunas peptídicas).

Síntesis y estructura

Todas las sustancias farmacológicas son péptidos lineales con un grupo amino libre en el extremo N-terminal y un grupo carboxilo libre en el extremo C-terminal. Los aniones trifluoroacetato se unen en forma iónica a grupos básicos de la molécula peptídica. Todos los restos de aminoácidos están en la configuración L y no están modificados químicamente en ninguna posición. Todos los péptidos de depósito se fabrican en una instalación que contiene certificados para la producción de péptidos sintéticos de grado GMP. Todos los péptidos son péptidos sintéticos, que se fabrican mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) bien establecidos usando química de Fmoc.

2.2 Ligando XS15 de TLR1/2

El ligando XS15 de TLR1/2 se usa como adyuvante en los ensayos de P/T-pVAC-SARS-CoV-2 para inducir respuestas de las células T fuertes y de larga duración. El lipopéptido XS15, nombre químico N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2R)-propil]- (R)-cisteinil-GDPKHPKSF, es un derivado de Pam3Cys sintético soluble en agua. Como ligando de TLR1/2 se incluirá como un adyuvante en la mezcla de péptidos de cada voluntario/paciente inscrito en los ensayos de P/T-pVAC-SARS-CoV-2. El clorhidrato de XS15 es un péptido de diez aminoácidos lineal sintético con un extremo N palmitoilado. Todos los aminoácidos ópticamente activos están en configuración L. La sustancia farmacológica se aísla como una sal de clorhidrato. La estructura primaria del clorhidrato de XS15 se da mediante su ruta de síntesis y la identidad puede confirmarse mediante espectrometría de masas. El XS15 se prepara (Bachem AG, Bubendorf, Suiza) como un ingrediente farmacéutico activo siguiendo las directrices de GMP relevantes, concretamente ICH Q7 y Parte 2 de la directriz de EU GMP. El fabricante ha sido inspeccionado regular y satisfactoriamente por Swiss Agency for Therapeutic Products (Swissmedic) y es responsable de la fabricación, prueba y liberación así como almacenamiento y envío del clorhidrato de XS15. Por favor, consúltese el IB de XS15 (1.0. 27 mayo 2020).

2.3 Montanide ISA 51 VG

Montanide es fabricado por Seppic y por el fabricante remunerado Elaiapharm, respectivamente. Montanide ISA 51 VG se usa como adyuvante en los ensayos de P/T-pVAC-SARS-CoV-2 para emulsionar la mezcla de péptidos (incluyendo péptidos derivados de SARS-CoV-2 y XS15). Montanide ISA 51 VG se define como una mezcla de un aceite mineral altamente purificado (Drakeol 6VR) y un tensioactivo (monooleato de manida). Cuando se mezcla con una fase acuosa en una relación 50/50, se obtiene una emulsión de agua en aceite. Esta emulsión de agua en aceite se usa como adyuvante de vacuna, con el fin de potenciar la respuesta inmunitaria contra antígenos. Para la información preclínica detallada sobre Montanide ISA 51 VG se hace referencia al IB de Montanide ISA 51 VG (3291/GB/03/junio de 2019).

2.4 Formulación

Las mezclas de péptidos están formuladas por the University of Tübingen (Departamento de Inmunología) que incluye los péptidos de HLA-DR heterogéneos 10 (Tabla 1) o 6 (Tabla 2) (240 µg cada uno) derivados de diferentes proteínas de SARS-CoV-2 y el ligando XS15 de TLR1/2. El DP de CoVac-1 final es una emulsión de agua en aceite de la mezcla de péptidos como se describió anteriormente y Montanide ISA 51 VG. Todos los componentes serán proporcionados por el Wirkstoffpeptidlabor del Departamento de Inmunología en Tübingen junto con un "kit de mezcla" que permite la mezcla de los dos componentes por la farmacia de los centros participantes (mezcla de péptidos, Montanide ISA 51 VG). El Wirkstoffpeptidlabor contiene certificados para la producción de péptidos sintéticos de grado GMP y para la formulación de mezclas de vacunas muropeptídicas que incluyen el ligando XS15 de TLR1/2. Las mezclas de péptidos son formulaciones líquidas que consisten en las sustancias farmacológicas disueltas en DMSO al 33% en agua para inyección (WFI). No se añaden excipientes. Las mezclas de péptidos se empaquetan en viales de 1 ml usando la tecnología de vial cerrado Crystal® y tapado con un tapón de engarce flip-off. Cada vial es solamente para un solo uso. Las mezclas de péptidos se fabrican asépticamente. Los análisis de endotoxinas, esterilidad, partículas visibles y pH de la disolución se realizan según la Farmacopea Europea (EP). Las mezclas de péptidos (incluyendo el ligando XS15 de TLR1/2) se marcan con un código de identificación que puede asignarse definitivamente al ensayo clínico. La medicación de prueba se marca según § 5 de GCP-V. Las muestras de los marcadores se archivan en el archivo maestro de prueba (TMF). La mezcla de vacunas peptídicas se empaqueta junto con Montanide ISA 51 VG y el equipo de mezcla en el "kit de mezcla" y se envía desde el Wirkstoffpeptidlabor del Departamento de Inmunología, Tübingen, a la farmacia de los centros participantes. El envío se documenta según el procedimiento de operación estándar. El "kit de mezcla" se envía usando un envase aislado con un sistema de control de temperatura automatizado, que tiene que devolverse al Wirkstoffpeptidlabor del Departamento de Inmunología junto con el acuse de recibo después de la entrega del envío. El dispositivo se lee para documentar las temperaturas de almacenamiento correctas durante el envío. Los datos se documentan según el procedimiento de operación estándar. El envío se realiza por un asociado

del Wirkstoffpeptidlabor del Departamento de Inmunología, Tübingen. Las soluciones de mezclas de péptidos deben almacenarse a -20°C.

2.5 Dosificación

Mezcla de péptidos

- 5 Las mezclas de péptidos para el producto farmacológico (DP) de CoVac-1 son formulaciones líquidas que consisten en las sustancias farmacológicas disueltas en DMSO al 33%. Las mezclas de péptidos que se van a usar en los ensayos de P/T-pVAC-SARS-CoV-2 consisten en 10 (Tabla 1) o 6 (Tabla 2) péptidos diferentes con 1 mg/ml por péptido y el ligando XS15 de TLR1/2 con 0,2 mg/ml. Cada vial contiene 700 µl.

Montanide ISA 51 VG

- 10 Antes de la administración al sitio de estudio, la mezcla de péptidos se emulga en una emulsión de agua-aceite 1:1 con Montanide ISA 51 VG por la farmacia de los centros participantes según un "Mischanleitung" proporcionado con el "kit de mezcla" del Wirkstoffpeptidlabor del Departamento de Inmunología.

CoVAC-1

- 15 El producto farmacológico final de CoVAC-1 se administra como una solución de agua-aceite por la farmacia de los centros participantes en el sitio de prueba respectivo en una jeringa con un volumen final de 500 µl (aprox. 240 µg por péptido, 50 µg de XS15).

Instrucciones para el manejo y almacenamiento del DP de Co Vac-1

- 20 Se aplica una dosis única de la vacuna de CoVac-1 por vía subcutánea (s.c.) en la piel abdominal del voluntario/paciente del estudio. Las instrucciones específicas del estudio se describen en the Clinical Study Protocols. Cada vial de CoVac-1 se marca con un código específico del estudio. Se usa una técnica aséptica cuando se preparan vacunas de CoVac-1 para la administración. Cada vial del DP de CoVac-1 es solamente para un solo uso. El producto farmacológico de la vacuna final se almacena a temperatura ambiente y se administra dentro de las 24 h después de mezclar los componentes.

2.6 Régimen de dosificación y programa y sitio de vacunación

- 25 Por voluntario/paciente se aplica una sola vacunación con la vacuna de CoVac-1 por vía subcutánea. Esto se basa en las primeras experiencias clínicas con vacunas peptídicas individualizadas combinadas con el ligando XS15 de TLR1/2 en un voluntario sano y pacientes con cáncer. El uso de XS15 permite inducir respuestas de células T fuertes y de larga duración contra péptidos de vacuna en el 100% de voluntarios sanos (HV) vacunados y pacientes después de una inyección. Estos datos permiten reducir el número de vacunaciones y la duración de la fase de vacunación en comparación con estudios previos.

- 30 Se realizaron ensayos de vacunación previos a dosis peptídicas que variaban de 10 a 5000 µg por vacunación. Aunque sólo unos pocos de estos ensayos incluyeron un elemento de determinación de dosis, existe una tendencia a que dosis por debajo de 100 µg no sean eficaces para inducir las respuestas de células T, mientras que dosis por encima de 500 µg no parecen generar una inmunogenicidad creciente. Los estudios de determinación de dosis realizados con epítopos derivados de proteínas virales mostraron respuestas inmunitarias significativamente más fuertes en el intervalo de 300-500 µg frente a la dosis de 100 µg, sin respuestas inmunitarias significativamente mayores en el grupo de 1000 frente a 500 µg (Kran et al. HLA- and dose-dependent immunogenicity of a peptide-based HIV-1 immunotherapy candidate (Vacc-4x). AIDS. 2004; 18(14):1875-1883). Basándose en las observaciones resumidas brevemente anteriormente, se prevé que la dosis ideal para un péptido esté en el intervalo entre 100 y 500 µg con una fuerte preferencia por el intervalo superior. La dosis de ~240 µg por péptido por dosis para la vacuna de CoVac-1 se seleccionó en base a estos descubrimientos y a la viabilidad en el desarrollo farmacéutico de las vacunas. Con esta dosis pudo mostrarse la inducción de una fuerte respuesta de las células T para dos de los péptidos incluidos en la vacuna de CoVac-1 en combinación con XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG pudo mostrarse.

Razonamiento para la dosis del péptido de CoVac-1

- 45 Basándose en los siguientes datos, se aplica la vacuna peptídica con una dosis de 240 µg por péptido:

- Los ensayos de vacunación con péptidos de fase II y III realizados por Immatix Biotechnologies GmbH en pacientes con RCC metastásico demostraron un perfil de seguridad y tolerancia muy bueno para una mezcla de péptidos con 10 péptidos y una dosis de 413 µg por péptido. Otro estudio del Departamento de Inmunología en Tübingen en pacientes con cáncer de próstata metastásico también mostró una buena tolerancia para una mezcla de vacunas que incluía 13 péptidos con una dosis de 300 µg por péptido (Feyerabend et al. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. Prostate. 2009; 69(9):917-927).

• Sato et al. (Sato et al. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.* 2003; 94(9):802-808) investigaron una vacuna peptídica en pacientes con cáncer gástrico avanzado compuesta de 14-16 péptidos con una dosis de 30 mg por péptido. Incluso con esa dosis muy alta de vacuna peptídica, no se observaron efectos secundarios graves. Además, el grupo de Noguchi (Noguchi et al. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate.* 2003; 57(1):80-92) mostró un perfil de tolerancia y seguridad bueno para una vacuna peptídica compuesta por 14 péptidos y una dosis de 9 mg por péptido.

• Un estudio iVAC-CLL01 en curso aplica mezclas de vacunas peptídicas personalizadas (9 péptidos a 300 µg) que muestran un perfil de seguridad y tolerancia muy bueno.

• Los datos preliminares de un voluntario sano y pacientes con cáncer vacunados con una vacuna peptídica personalizada (240-300 µg por péptido) en combinación con XS15 mostraron una inducción potente de las respuestas de células T en el 100% de voluntarios sanos (HV) y pacientes y un buen perfil de seguridad.

• Los datos preliminares de un voluntario sano vacunado con dos de los péptidos (240 µg por péptido) incluidos en la vacuna de CoVac-1 en combinación con XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG mostraron la inducción de una respuesta de las células T CD4⁺ fuerte y un buen perfil de seguridad.

Monitorización después de la vacunación con péptidos

Para proporcionar un máximo de seguridad para los pacientes tratados en los estudios de P/T-pVAC-SARS-CoV-2, el seguimiento después de la vacunación con péptidos se realiza como sigue:

• Todos los pacientes se monitorizan durante 2 horas después de la vacunación, incluyendo la monitorización estrecha de la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, la temperatura y el bienestar subjetivo. Los estudios de vacunación con péptidos realizados en pacientes con enfermedades infecciosas así como con cáncer mostraron que un tiempo de monitorización de 1-2 horas proporciona una seguridad óptima para el paciente. En estos estudios, las reacciones alérgicas se produjeron principalmente 1 hora después de la vacunación.

• La monitorización de los pacientes se lleva a cabo por enfermeras y médicos especialmente entrenados. La monitorización incluye comprobaciones regulares de los parámetros vitales del paciente (presión sanguínea, pulso, temperatura, saturación de oxígeno) para garantizar la detección temprana de efectos secundarios, especialmente reacciones alérgicas. Cada unidad de monitorización está equipada con un carrito de emergencia y un equipo de cuidados intensivos estará a la espera.

Sitio de vacunación

Las vacunas de CoVac-1 se aplican por vía subcutánea en el abdomen de los pacientes basándose en el siguiente razonamiento:

La vacuna peptídica IMA901 (para el tratamiento de RCC) se ha ensayado en dos estudios clínicos completados donde se había aplicado a un total de 96 pacientes. En el estudio de fase I (n=30), se permitió la vacunación en el muslo, abdomen y piel del antebrazo. En 27 pacientes evaluables para las respuestas inmunitarias, la vacunación en la piel del abdomen fue numéricamente, pero no significativamente mejor en términos de tasa de respuesta inmunitaria lograda (88% n=8 versus 64% n=14, y 60% n=5) para muslo y antebrazo, respectivamente; por ejemplo p=0,75 abdomen versus otro; prueba exacta de Fisher). En el estudio de fase II (n=68), se permitieron vacunaciones en el muslo y el abdomen, y de nuevo las tasas de respuesta inmunitaria y las tasas de respuesta de múltiples péptidos fueron muy comparables y no difirieron significativamente entre sí (por ejemplo, 27,5% de respuesta de múltiples péptidos después de la vacunación en la piel abdominal (n=40) versus 23,8% después de la vacunación en el muslo (n=21)). Además, el trabajo preclínico en un modelo de ratón (tumor cerebral, glioma) mostró que la vacunación en la pata delantera es menos eficaz en la inducción de respuestas inmunitarias en comparación con la vacunación en un sitio más distante (pata trasera), potencialmente debido a la influencia inmunosupresora del tumor en el drenaje linfático del tumor (Ohlfest et al. Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CD8 T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. *J Immunol.* 2013; 190(2):613-620).

2.7 Información preclínica

Péptidos derivados de SARS-CoV-2 (sustancias farmacológicas)

La mezcla de péptidos incluida en la vacuna de CoVac-1 consiste en diez (Tabla 1) o seis (Tabla 2) péptidos de HLA-DR heterogéneos de diferentes proteínas (ORFs) del virus SARS-CoV-2. Utilizando el algoritmo SYFPEITHI (www.syfpeithi.de; Rammensee et al. 1999, *I.c.*) se seleccionaron secuencias peptídicas que muestran una puntuación de unión alta para varios alotipos de HLA-DR y por lo tanto pueden usarse ampliamente en la población. Además, se seleccionaron especialmente aquellos péptidos de HLA-DR que contienen secuencias de HLA de clase I embebidas para inducir las respuestas de las células T CD4⁺ así como las respuestas de las células T CD8⁺. Además, para

péptidos de proteínas de superficie de virus, sólo se seleccionaron secuencias que no representan epítomos de anticuerpos, ya que no son accesibles a anticuerpos debido a la estructura 3D predicha de la proteína. Esto debería prevenir la formación de anticuerpos contra los péptidos vacunados, lo que podría conducir posiblemente a un deterioro de la patología pulmonar. Se probó la inmunogenicidad para todos los péptidos de HLA-DR incluidos en la mezcla de péptidos en una gran cohorte de donantes convalecientes de SARS-CoV-2 que prueba el papel significativo de estos epítomos de células T en el curso natural de la infección por SARS-CoV-2. Además, ya se aplicaron dos péptidos en un enfoque de vacunación en un solo voluntario sano, induciendo una fuerte respuesta de las células T CD4⁺. Los péptidos de HLA-DR derivados de SARS-CoV-2 activarán las células CD4⁺ Th1 que contribuyen directamente a la eliminación del virus y suministran fuertes señales de auxiliares-T a las células T CD8⁺ cebadas por las secuencias de HLA de clase I embebidas en la vacuna de CoVac-1 o durante la infección natural. Además, en términos de una infección por SARS-CoV-2, estas células CD4⁺Th1 específicas de SARS-CoV-2 deberían activar vigorosamente las células B experimentadas por antígeno vírico. La actividad potenciada resultante podría conducir a una eliminación más rápida del virus y la prevención del curso grave de COVID-19.

2.8 Farmacocinética

La vacuna de CoVac-1 se inyecta por vía subcutánea. Los estudios de biodistribución y farmacocinéticos para los péptidos derivados de SARS-CoV-2 incluidos no se han realizado ya que habitualmente no se realizan en vacunas, ya que los componentes de la vacuna están destinados a unirse inmediatamente a moléculas HLA expresadas en poblaciones de células locales (es decir, células dendríticas (DCs)). Además, los péptidos son generalmente de vida extremadamente corta en fluidos biológicos.

2.9 Experiencia clínica

Se han aplicado vacunas peptídicas en combinación con XS15 emulsionadas en Montanide ISA 51 VG similares al DP de CoVaC-1 en un voluntario sano (Rammensee et al. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *J Immunother Cancer*. 2019; 7 (1):307) y pacientes con cáncer que inducen una respuesta de las células T CD8⁺ y CD4⁺ Th1 fuerte y de larga duración a péptidos virales (incluyendo péptidos derivados de SARS-CoV-2), neoepítomos de mutaciones específicas de cáncer así como a auto-péptidos asociados a tumores. Además de la formación de granuloma localmente en el lado de la inyección, no se han observado efectos secundarios relevantes, especialmente ninguna reacción alérgica o anafiláctica o síndrome de liberación de citocinas, después de una única aplicación de la vacuna. Montanide ISA 51 VG se ha usado en más de 200 ensayos clínicos incluyendo más de 6000 pacientes. Los efectos secundarios más comunes son la reacción en el sitio de inyección (68%), incluyendo el desarrollo de granuloma, fatiga (54%), fiebre (41%), trastornos gastrointestinales (32%) y eritema en el sitio de inyección o local (28%) (Van Gatern et al. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(1):159-169). En general, los adversos observados de los ensayos controlados con individuos no sanos así como sanos eran de intensidad leve a moderada. Para más detalles se hace referencia al IB de Montanide ISA 51 VG (3291/GB/03/junio de 2019).

2.10 Elección de fármacos adyuvantes para el estudio de P/T-pVAC-SARS-CoV-2

Para los estudios de P/T-pVAC-SARS-CoV-2 se realizaron las siguientes consideraciones sobre los fármacos adyuvantes:

Un requisito previo principal para la vacunación con péptidos, además de la selección de dianas antigénicas óptimas, es el uso de un adyuvante adecuado, que puede inducir respuestas inmunitarias fuertes y de larga duración. Entre los métodos de vacunación con péptidos más eficaces ensayados en seres humanos está la inyección subcutánea de péptidos emulsionados en Montanide ISA 51 VG, una emulsión de agua en aceite, combinada con el ligando CpG de TLR9 (Baumgaertner et al. Vaccination-induced functional competence of circulating human tumor-specific CD8 T-cells. *Int J Cancer*. 2012; 130(11):2607-2617). Sin embargo, CpG no está disponible para ensayos clínicos y una vacuna de péptido/antígeno emulsionada en Montanide sin ningún adyuvante adicional muestra sólo una respuesta inmunitaria semanal (Freund J. The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. *Am J Clin Pathol*. 1951; 21(7):645-656.). Por lo tanto, los inventores eligen para el estudio de P/T-pVAC-SARS-CoV-2 el nuevo ligando XS15 de TLR1/2. XS15 es un derivado soluble en agua del ligando Pam3Cys de TLR1/2 que induce una respuesta de células T CD8⁺ y CD4⁺ Th1 fuerte contra péptidos cortos libres en Montanide ISA 51 VG después de inyección s.c. en voluntarios sanos así como en pacientes (Rammensee et al. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *J Immunother Cancer*. 2019; 7(1):307). Se pudieron inducir respuestas inmunitarias para péptidos virales (incluyendo péptidos derivados de SARS-CoV-2), neoepítomos de mutaciones específicas de cáncer, así como para auto-péptidos asociados a tumores. La vacunación con péptidos con XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG da como resultado la formación de granuloma en el sitio de vacunación donde los péptidos vacunados persisten durante al menos 7 semanas. Además, las células T específicas de péptido también se pudieron detectar en el sitio del granuloma, sin embargo, con una frecuencia menor que la observada en la sangre periférica, lo que confirma que no hay riesgo de secuestro, disfunción o eliminación de células T en el sitio de vacunación usando XS15 en Montanide ISA 51 VG. Sorprendentemente, las respuestas inmunitarias inducidas persisten durante más de 1,5 años. La vacunación con múltiples péptidos con XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG mostró un buen perfil de seguridad sin ningún efecto secundario sistémico

hasta ahora ninguna reacción alérgica como se reportó para vacunas con péptidos aplicadas en combinación con GM-CSF. Por lo tanto, XS15 y Montanide ISA 51 VG servirán como adyuvantes para las vacunas de CoVac-1. Puede encontrarse información detallada del lipopéptido XS15 que se incluye en la mezcla de vacunas en el IB de XS15 (1,0. 27 de mayo de 2020). Puede encontrarse información detallada de Montanide ISA 51 VG en el IB de Montanide ISA 51 VG (3291/GB/03/junio de 2019).

2.11 Efectos de XS15 en seres humanos

Evidencia de la auto-administración de vacunas con adyuvante XS15

La vacunación de un individuo sano utilizando XS15 como un adyuvante se ha descrito y publicado (Rammensee et al. 2019, *l.c.*) En este auto-experimento se usó una dosificación de 80 µg de XS15 además de Montanide ISA 51 VG y una vacuna de múltiples péptidos con péptidos sintéticos derivados del virus. En la presente memoria se describió un granuloma indoloro que se formaba en el sitio de inyección con un volumen que aumentaba hasta aproximadamente 8 ml, como se midió mediante ultrasonidos (días 17 y 41 después de la administración), sin ningún signo sonográfico de infección. Después de 21 días apareció como una induración bien palpable de aproximadamente 2 x 2 cm, con una superficie rojiza central. Se describió que el granuloma no era sensible al tacto, mientras que se reportó que la superficie de la piel picaba ligeramente.

Con respecto a las respuestas inmunitarias y al ser consciente de que esto es una prueba puramente anecdótica, una única vacunación indujo respuestas fuertes medibles *ex vivo* de CD8⁺ y CD4⁺ TH1 en un voluntario humano después de una sola inyección de XS15 mezclado con péptidos no acoplados en una emulsión de agua en aceite. El granuloma que se formó localmente en el sitio de inyección que contenía células T de memoria efectoras CD4⁺ y CD8⁺ funcionales altamente activadas. Además, las células T respectivas se podrían caracterizar en circulación. Las respuestas *ex vivo* de células T en sangre periférica eran detectables durante más de un año y podían ser fuertemente potenciadas por una segunda vacunación.

Un informe más actual de auto-vacunación del mismo individuo incluye la administración de péptidos derivados de SARS-CoV-2 realizada en marzo de 2020. Aquí, el voluntario sano auto-experimentante usó ocho péptidos derivados de SARS-CoV-2: cinco predichos para unirse a moléculas HLA de clase I (péptidos CD8) y tres predichos para unirse a moléculas HLA-DR (péptidos CD4, incluyendo dos péptidos de la vacuna de CoVac-1). La formulación de vacuna incluía también un péptido largo y uno corto derivado de CMV-pp65 que se había administrado previamente al mismo individuo y podría actuar por lo tanto como controles positivos. Aproximadamente 3 semanas después de una única vacunación, usando una vacuna que contiene los péptidos sintéticos mencionados, Montanide y que contiene 50 µg de XS15, pudieron detectarse fuertes respuestas de células T CD4⁺ inducidas por una vacuna contra los cuatro péptidos de HLA-DR y contra el epítipo de recuerdo de CMV. No pudieron detectarse respuestas de células T contra los cinco péptidos de HLA de clase I predichos del SARS-CoV-2 mediante el ensayo ELISpot de interferón-γ *ex vivo*. Además, no se observó inducción de anticuerpos contra los péptidos de la vacuna 83. La vacunación fue bien tolerada sin ningún efecto secundario sistémico. Se observó formación de granuloma en el sitio de vacunación.

Evidencia preliminar de intervenciones no probadas usando vacunas con adyuvante XS15 en pacientes con cáncer

En intervenciones clínicas no probadas que usan vacunas con adyuvante XS15 como un esfuerzo de tratamiento según el criterio del médico y con consentimiento informado, según el principio 37 de la Declaration of Helsinki, se vacunaron pacientes con cáncer con diferentes malignidades. Los pacientes respectivos tuvieron diversos tratamientos previos y se han vacunado con vacunas peptídicas personalizadas en combinación con XS15 (50 µg) emulsionado en Montanide ISA 51 VG. A continuación se proporciona una descripción detallada de las características del paciente (Tabla 7). Cada vacuna peptídica se diseñó individualmente para cada paciente, basándose en análisis de ligandos de HLA basados en MS/MS y secuenciación de panel que caracteriza mutaciones individuales en el tejido tumoral para descubrimiento de dianas. Se administraron hasta tres vacunaciones por paciente. El período de seguimiento medio por paciente es de 14 meses (2-36 meses) después de la primera vacunación. Las vacunas descritas se aplicaron s.c. en la piel abdominal. Todos los pacientes vacunados mostraron respuestas de las células T específicas de vacunas peptídicas después de la primera vacunación, que podrían ser reforzadas por vacunaciones posteriores. Las respuestas inducidas de células T fueron de larga duración (hasta 19 meses) después del final de la vacunación (Figura 3).

Debido al carácter anecdótico de las intervenciones descritas en la presente memoria, tales como las principales diferencias entre pacientes, así como diversas entidades cancerosas, tratamiento previo, composición de la vacuna y medicación concomitante (cancerosa), no se pretende un análisis conjunto de los datos con respecto a estas vacunaciones peptídicas en combinación con XS15. Las características de los sujetos que reciben vacunas peptídicas individualizadas en combinación con XS15 se proporcionan a continuación.

Tabla 7: Características del paciente de intervenciones con vacunas peptídicas individualizadas que contienen XS15 emulsionadas en Montanide

Paciente	Sexo	Edad	Entidad tumoral	HLA-	# Mutaciones sin sentido	# Péptidos en la mezcla de vacunas	#Vacunaciones	Respuesta inmunitaria [n péptidos positivos]	Respuesta clínica [mejor respuesta]
1	m	85	Carcinoma hepatocelular	A*25/B*26, B*08/B*57, C*07/C*03	4	10	2	2	PR
2	f	78	Cáncer de colon	A*11/A*68, B*38/B*44, C*12/C*07	13	9	3	3	PR
3	f	67	Carcinoma hepatocelular	A*02/A*03, B*15/B*47, C*03/C*06	2	9	3	3	SD
4	m	61	Carcinoma hepatocelular	A*01/A*68, B*08/B*14, C*07/C*08	4	7	3	1	PR
5	m	36	Sarcoma	A*11/A*24, B*14/B*15, C*04/C*08	0	10	2	4	PR
6	m	61	Mesotelioma	A*02/A*25, B*15/B*46, C*03/C*04	2	10	1	2	n.a.
7	m	58	Cáncer de origen primario desconocido (CUP)	A*01/A*24, B*07/B*14, C*07/C*08	4	9	2	4	PR

8	m	72	Cáncer de próstata	A'25/A'32, B'18/B'35, C'04/C'12	3	9	2	7	n.a.
9	f	41	Cáncer de ovario	A'02/A'24, B'07/B'51 C'07/C'14	4	9	1	2	n.a.
10	m	63	Melanoma	A'02/A'29, B'35/B'44, C'04/C'05	4	9	1	2	n.a.
11	w	66	Osteomielofibrosis	A'03/A'34 B'15/B'35 C'03/C'04	n.a.	8-10	3	8	PR
12	w	23	Carcinoma hepatocelular	A'02/A'25 B'27/B'57 C'03/C'06	n.a.	10	2	5	SD

Perfil de sucesos adversos

No se produjeron sucesos adversos sistémicos en ninguno de los pacientes vacunados y las vacunaciones fueron bien toleradas. No se observó fiebre ni ningún otro signo de reacción inmunitaria exuberante. Según el perfil esperado de sucesos adversos de Montanide, un granuloma subcutáneo asintomático se desarrolló durante 1-3 semanas después de la vacunación. Los granulomas más comunes fueron enrojecimiento e hinchazón transitorios en el sitio de la vacunación (Tabla 8). Después de la vacunación múltiple, se observó ulceración del granuloma en 5/12 pacientes (41%), dando como resultado una ulceración aséptica de la piel que cicatrizó en dos semanas sin requerir ninguna intervención o tratamiento adicional.

10 Tabla 8: Resumen de sucesos locales observados atribuidos al uso de Montanide en pacientes con cáncer.

Paciente #	Reacción local en el sitio de vacunación	
	Después de 1. vacunación	Después de múltiples vacunaciones
1	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 0,5 cm)	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 2 cm)
2	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 3 cm)	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 3 cm)
3	granuloma s.c. (Ø máx. 2 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel	granuloma s.c. (Ø máx. 2 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel, ulceración aséptica de la piel
4	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 3 cm)	Granuloma s.c. (Ø máx. 4 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel, ulceración aséptica de la piel
5	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 1 cm)	granuloma s.c. (Ø máx. 2 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel, ulceración aséptica de la piel
6	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 1 cm)	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 2 cm)
7	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 1 cm)	granuloma s.a. (Ø máx. 3 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel
8	granuloma s.c. (Ø máx. 3 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel	granuloma s.c. (Ø máx. 3 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel, ulceración aséptica de la piel
9	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 2 cm)	granuloma s.c. (Ø máx. 2 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel
10	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 1 cm)	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 1 cm)
11	granuloma s.c. (Ø máx. 2 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel	granuloma s.c. (Ø máx. 4 cm), enrojecimiento e hinchazón de la piel, ulceración aséptica de la piel
12	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 2 cm)	granuloma s.c. asintomático (Ø máx. 3 cm)

3. Efectos en humanos**3.1 Efectos de vacunas de CoVac-1 en seres humanos**

15 El estudio de P-pVAC-SARS-CoV-2 es un ensayo primero en el hombre de un enfoque de vacunación con SARS-CoV-2 basado en péptidos en combinación con el ligando XS15 de TLR1/2 en voluntarios sanos. Esta sección proporciona los primeros datos de seguridad e inmunogenicidad de CoVac-1 en la primera parte del estudio (Parte I) del estudio de P-pVAC-SARS-CoV-2. Además, se presentarán los datos de un enfoque de vacunación en un voluntario sano que aplica dos de los péptidos de CoVac-1 y XS15 emulsionado en Montanide ISA 51 VG. Como concepto principal de inmunización multipéptídica está bien establecido en la terapia de enfermedades infecciosas y del cáncer.

3.2 Parte I del ensayo de fase I de P-pVAC-SARS-CoV-2

Datos de inmunogenicidad

P-pVAC-SARS-CoV-2 es un ensayo de seguridad e inmunogenicidad en un solo centro de fase I de vacunación multipeptídica con CoVac-1 para prevenir la infección por COVID-19 en adultos. El estudio está reclutando desde noviembre de 2020 y ha completado la primera parte (voluntarios sanos (n=12), edad 18-55 años) en febrero de 2021. Se aplicó una única vacunación subcutánea de CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos; Tabla 2). La inmunogenicidad, en términos de inducción de respuestas de las células T a uno o más de los seis epítomos de las células T de SARS-CoV-2 de HLA-DR incluidos en la vacuna de CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) se evaluó antes de la vacunación, así como en los días 7, 15 y 28 después de la vacunación (Figura 4).

La inducción de células T de SARS-CoV-2 se mostró en 100% (12/12) de voluntarios en la parte I del estudio. Se observaron las respuestas de células T más tempranas en el día 14 para 11/12 sujetos. Se indujeron respuestas inmunitarias a múltiples de los péptidos de la vacuna (media 5/sujeto, intervalo 4-6).

Por lo tanto, se mostró una alta inmunogenicidad de CoVac-1 para inducir las respuestas de células T tempranas y multipeptídicas. En la Figura 5 se representa un ELISPOT ejemplar.

Las respuestas de células T inducidas por CoVac-1 fueron multifuncionales con positividad para TNF (12/12 sujetos), IFN- γ (12/12 sujetos) e IL-2 (11/12 sujetos, Figura 6). CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos, Tabla 2) indujo una alta frecuencia de células T de SARS-CoV-2 funcionales con hasta el 1,8% de IFN- γ +, 2,7% de TNF+ y 2,5% de IL-2+ células T específicas de SARS-CoV-2 (Figura 6).

Además de las respuestas de células T CD4+, CoVac-1 también indujo las respuestas de las células T CD8+ en el 75% de los donantes. Se demostró que estas células T CD8+ dirigidas a epítomos de células T de HLA de clase I embebidos en los péptidos de la vacuna de HLA-DR CoVac-1 eran de relevancia patofisiológica durante la infección natural por SARS-CoV-2 (Figura 6).

Comparación de CoVac-1 con vacunas de SARS-COV-2 aprobadas (BNT126b2, Biontech SE; mRNA-12738, Moderna, Inc.; ChAdOx1, AstraZeneca)

A diferencia de los candidatos de vacuna aprobados que requieren dos vacunaciones, CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) induce fuertes respuestas de las células T después de una única vacunación.

CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) induce respuestas de células T de SARS-CoV-2 más tempranas y fuertes después de una única vacunación en comparación con los candidatos de vacuna aprobados:

- CoVac-1 induce respuestas tempranas de células T (91,6% el día 14) después de una vacunación, en comparación con BNT16B1 y mRNA-1273, para las que se reportaron las respuestas más tempranas de células T el día 29 después de dos y una vacunación, respectivamente.
- Frecuencia media de IFN- γ inducido por CoVac-1 y células T CD4+ de SARS-CoV-2 de IL-2 el día 28 después de una vacunación fueron del 0,5% y el 0,9%, respectivamente, en comparación con el 0,03% y el 0,06%, respectivamente, para BNT16B1 el día 29 después de dos vacunaciones (Figura 8).
- Frecuencia media de IFN- γ inducido por CoVac-1 y células T CD4+ de SARS-CoV-2 de IL-2 el día 28 después de una vacunación fueron del 0,5% y el 0,9%, respectivamente, en comparación con aproximadamente el 0,03% y el 0,05%, respectivamente para el mRNA-1273 el día 29 después de una vacunación (Figura 8).
- La intensidad de las respuestas de células T de SARS-CoV-2 inducidas por CoVac-1 el día 28 después de una única vacunación según se evaluó mediante ELISPOT de IFN- γ fue de 897 recuentos de manchas por 1×10^6 células (valor medio) en comparación con 493 recuentos de manchas (valor medio) para ChAdOx1 nCoV-19 el día 28 después de una vacunación (Figura 9).
- La comparación directa de las respuestas de células T a los péptidos de CoVac-1 de los presentes inventores (incluyendo epítomos de células T de diversas proteínas de SARS-CoV-2) en sujetos de estudio de P-pVAC-SARS-CoV-2 (n = 12) en los días 28 después de una única vacunación y voluntarios sanos (n = 6) media 25 días después de la segunda vacunación con BNT162b2 reveló respuestas de células T específicas de SARS-CoV-2 en el 100% (12/12) en comparación con el 17% (1/6) de sujetos con intensidades medias de respuesta de células T de 1772 y 7 recuentos de manchas normalizados por 1×10^6 células, respectivamente (Figura 10).

Impacto de las variantes de SARS-CoV-2 en CoVac-1

- El impacto de las variantes de interés (VOC) de SARS-CoV-2 declarado por the World Health Organization del 1 de julio de 2021 (B.1.1.7 - Alfa, B.1.351 - Beta, P.1 - Gamma, B.1.617.2 - Delta) en CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) se evaluó en términos de secuencia peptídica de la vacuna y las alteraciones de la respuesta de las células T inducidas por la vacuna. 3/6 (50%) de los péptidos de la vacuna de CoVac-1 no se ven afectados por ninguna mutación asociada o que define variantes del VOC de SARS-CoV-2. Ninguna de las mutaciones de las variantes P.1 y B.1.617.2 afecta a ninguno de los péptidos de la vacuna de CoVac-1. La variante B.1.1.7 comprende dos mutaciones que afectan a P2_nuc y P6_ORF8 con un solo cambio de aminoácido, respectivamente. Dos mutaciones de la variante B.1.351 afectan a P3_spi con uno o dos cambios de aminoácidos (Figura 11A).
- Las respuestas de células T de IFN- γ a conjuntos de péptidos que comprenden los péptidos mutados P2_nuc, P3_spi y P6_ORF8 de B.1.1.7 y B.351 fueron detectables en 24/24 (100%) de participantes de la Parte I y la Parte II con respuesta de células T inducida por CoVac-1 probada a péptidos de tipo nativo (WT) P2_nuc, P3_spi y P6_ORF8 (Figura 11B). Aunque la intensidad de las respuestas de células T en términos de manchas por 5×10^5 células para las variantes de péptido único P3 y P6 se redujeron en comparación con los péptidos WT, la intensidad de las respuestas de las células T inducidas por CoVac-1 que se dirigen a los conjuntos de péptidos variantes no se vio afectada y fue al menos 10 veces mayor que las respuestas de células T de memoria para los conjuntos de péptidos WT y variantes observados en HCs (Figura 11C).

3.3 Información de seguridad para péptidos de CoVac-1

- P-pVAC-SARS-CoV-2 es un ensayo de seguridad e inmunogenicidad de un solo centro de fase I de vacunación multipéptidica con CoVAC-1 para prevenir la infección por COVID-19 en adultos. El estudio está reclutando desde noviembre de 2020 y ha completado la primera parte (voluntarios sanos (n=12), edad 18-55 años) en febrero de 2021. Se aplicó una única vacunación subcutánea de CoVac-1. Los primeros datos de seguridad están disponibles hasta d28 (V4) después de la vacunación (véase más adelante).

- Además, se pueden sacar conclusiones de (i) estudios de vacunación con péptidos en enfermedades infecciosas (ii) el estudio iVAC-CLL01 en curso en pacientes con CLL basado en la misma tecnología del Departamento de Inmunología en Tübingen (iii) y vacunas contra el cáncer basadas en péptidos similares (por ejemplo, IMA901 y GAPVAC) y (iv) primeros datos de vacunas multipéptidicas en un voluntario sano y pacientes con cáncer en términos de intentos de cicatrización individuales. Hasta donde se reportó hasta la fecha, esas vacunas multipéptidicas se toleraban bien y el perfil de seguridad observado se consideraba aceptable.

30 Información preliminar de seguridad de la Parte I del estudio de P-pVAC-SARS-CoV-2

- P-pVAC-SARS-CoV-2 es un ensayo de un solo centro de fase I para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna multipéptidica de CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) después de una única aplicación subcutánea. Los sucesos tabulados tienen un carácter de "captura instantánea" según el estado de documentación el 15 de febrero de 2021. Hasta el día 28 no se reportaron efectos secundarios sistémicos, especialmente ninguna fiebre. No se observaron reacciones alérgicas. Como se pretendía y esperaba, todos los voluntarios (n=12) desarrollaron un granuloma local en el sitio de inyección. Otros sucesos adversos en el sitio de inyección local incluyeron eritema transitorio, picor, dolor y ulceración cutánea. Para una descripción detallada de todos los ADRs reportados por favor, véase de la tabla 9 a la tabla 13.

Tabla 1: Tabulación resumida de las reacciones adversas a fármacos (ADR, cualquier grado)

Suceso adverso (término CTCAE)	Grado (máx.)	Paciente (ID)	% de todos los sujetos
Complicación de la vacunación - eritema	3	pCOV-05, pCOV-06	16
Complicación de la vacunación - eritema	2	pCOV-07, pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18	42
Complicación de la vacunación - eritema	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-20	42
Complicación de la vacunación - hinchazón	2	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-18	25

Complicación de la vacunación - hinchazón	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-16, pCOV-20	75
Complicación de la vacunación - picor	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18, pCOV-20	83
Complicación de la vacunación - dolor	1	pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-11, pCOV-18, pCOV-20	58
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	2	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18	33
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-20	67
Ulceración de la piel	1	pCOV-11	8
Linfadenopatía del sitio de vacunación	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-16	42
Fatiga	1	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-12	25
Mialgia	1	pCOV-10	8
Artralgia	1	pCOV-16	8
Dolor de cabeza	1	pCOV-06, pCOV-10, pCOV-16	25
Nauseas	1	pCOV-11, pCOV-18	16

Tabla 2: Tabulación resumida de las reacciones adversas a fármacos sospechadas (SADR, cualquier grado)

Suceso adverso (término CTCAE)	Grado (máx.)	Paciente (ID)	% de todos los sujetos
Complicación de la vacunación - eritema	3	pCOV-05, pCOV-06	16
Complicación de la vacunación - eritema	2	pCOV-07, pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18	42
Complicación de la vacunación - eritema	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-20	42
Complicación de la vacunación - hinchazón	2	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-18	25
Complicación de la vacunación - hinchazón	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-16, pCOV-20	75

Complicación de la vacunación - picor	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18, pCOV-20	83
Complicación de la vacunación - dolor	1	pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-11, pCOV-18, pCOV-20	58
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	2	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18	33
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-20	67
Ulceración de la piel	1	pCOV-11	8
Linfadenopatía del sitio de vacunación	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-16	42
Fatiga	1	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-12	25
Mialgia	1	pCOV-10	8
Artralgia	1	pCOV-16	8
Dolor de cabeza	1	pCOV-06, pCOV-10, pCOV-16	25
Nauseas	1	pCOV-11, pCOV-18	16

Tabla 3: Tabulación resumida de las reacciones adversas a fármacos insospechadas (UADR, cualquier grado)

Suceso adverso (término CTCAE)	Grado (máx.)	Otra posible relación	Paciente (ID)
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 4: Tabulación resumida de AESI (cualquier grado)

AESI	Grado (máx.)	Paciente (ID)
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	2	pCOV-10, pCOV-11, pCOV-16, pCOV-18
Complicación de la vacunación - induración/granuloma	1	pCOV-02, pCOV-04, pCOV-05, pCOV-06, pCOV-07, pCOV-08, pCOV-12, pCOV-20

Tabla 5: Tabulación resumida acumulativa de todas las reacciones adversas a fármacos (ADR, cualquier grado); n = número de sujetos que han experimentado la SAR; SAR: reacción adversa sospechada; SOC: clase de órgano del sistema.

SOC	SARs	Número de sujetos expuestos (n) = 12
		Aparición de todos los SARs
		n (%)
Lesión, envenenamiento y complicaciones de procedimiento	Complicación de la vacunación - eritema	12 (100)
Lesión, envenenamiento y complicaciones de procedimiento	Complicación de la vacunación - hinchazón	12 (100)
Lesión, envenenamiento y complicaciones de procedimiento	Complicación de la vacunación - induración/granuloma	12 (100)
Lesión, envenenamiento y complicaciones de procedimiento	Complicación de la vacunación - picor	10 (83)
Lesión, envenenamiento y complicaciones de procedimiento	Complicación de la vacunación - dolor	7 (58)
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	Linfadenopatía del sitio de vacunación	5 (42)
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	Fatiga	3 (25)
Trastornos del sistema nervioso	Dolor de cabeza	2 (16)
Trastornos gastrointestinales	Nauseas	2 (16)
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	Ulceración de la piel	1 (8)
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo por desuso	Mialgia	1 (8)
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo por desuso	Artralgia	1 (8)

- 5 Estos resultados preliminares indicaron que CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos) se toleró bien a la dosis aplicada y no provocó efectos secundarios sistémicos relevantes.

Comparación de CoVac-1 con vacunas de SARS-COV-2 aprobadas (BNT126b2, Biontech SE; mRNA-12738, Moderna, Inc.; ChAdOx1, AstraZeneca)

- 10 A diferencia de los candidatos a vacunas aprobados (escalofríos 32%, fiebre 14% BNT126b2, escalofríos 50% fiebre 8% mRNA-12738, escalofríos 34%, fiebre 24% ChAdOx1 nCoV-19; AZD1222), no se reportó reacciones inflamatorias sistémicas para CoVac-1 (vacuna de 6 péptidos). No se necesitó tratamiento farmacológico iniciado por el investigador para los efectos secundarios inducidos por CoVac-1, mientras que se aconsejaba paracetamol de 1 g después de la vacunación cada 4-6 horas durante 24 horas después de la vacunación de manera rutinaria para los participantes en la fase 2/3 de ChAdOx1 de nCoV-19 de Astra Zeneca para reducir la posible reactividad de la vacunación.
- 15 Ninguno de los efectos secundarios reportados para la vacunación con CoVac-1 afectó la actividad de la vida diaria o

la capacidad de trabajo de los sujetos del estudio. Esto está en marcado contraste con los efectos secundarios inflamatorios provocados por candidatos de vacuna aprobados, en particular ChAdOx1 de nCoV-19, que provocan, por ejemplo, incapacidad para trabajar durante hasta 72 h en una gran proporción de sujetos vacunados.

- 5 La formación de granuloma en el sitio de vacunación también se reportó, aunque raramente, en sujetos después de la vacunación con BNT162b2. A diferencia del granuloma inducido por CoVac-1, se reportó de hecho que estas reacciones locales afectaban a la vida diaria del sujeto y también requerían tratamiento específico (por ejemplo, esteroides).

4. Beneficios

Los beneficios clínicos de la vacunación con CoVac-1 se basan en los siguientes aspectos:

- 10 * La vacunación con péptidos usando péptidos presentados por HLA representa un enfoque de inmunoterapia establecido para el desarrollo preventivo de vacunas en enfermedades infecciosas, así como para enfoques terapéuticos en enfermedades malignas. Varios estudios terapéuticos de vacunación con péptidos en pacientes con enfermedad maligna, incluyendo tumores sólidos y tumores malignos hematológicos, han probado la seguridad y tolerancia de este enfoque.
- 15 * La vacunación terapéutica con múltiples péptidos representa un enfoque de inmunoterapia de bajo efecto secundario que depende del reconocimiento inmunitario específico de los péptidos presentados por HLA.
- * Todos los péptidos incluidos en la vacuna de CoVac-1 son epítomos de células T de SARS-CoV-2 probados con relevancia patofisiológica en el curso natural de la enfermedad de COVID-19
- 20 * La vacunación con el péptido de CoVac-1 induce mediante sólo una dosis respuestas potentes de las células T CD8⁺ y CD4⁺ Th1 contra SARS-CoV-2, dando como resultado inmunidad contra la infección como:
- Las células CD4⁺ Th1 contribuyen directamente a la eliminación del virus y suministran fuertes señales de auxiliares T a células T CD8⁺ cebadas durante la infección natural. Además dichas células CD4⁺Th1 específicas de SARS-CoV-2 activan las células B con experiencia en antígenos virales. Se espera que el aumento resultante en la actividad permita la eliminación rápida del virus y la prevención del curso grave de la enfermedad de COVID-19.
- 25 • Los péptidos usados para la vacuna de CoVac-1 contienen epítomos de células T CD8⁺ embebidos predichos para que se unan a muchos alotipos de HLA de clase I diferentes. Una vez activado, las células T CD8⁺ pueden contribuir a una eliminación más rápida del virus.
- Las respuestas de células T de IFN- γ inducidas por CoVac-1 ampliaron las de convalecientes de COVID-19 y no se vieron afectadas por ninguna mutación de las variantes actuales de interés (VOC).
- 30 * La selección de participantes se basa en consideraciones de imperativo y seguridad médicos:
- El ensayo compromete tres partes (cohortes de participantes) con diferentes grupos de edad para proporcionar resultados preliminares sobre la seguridad en una cohorte de pacientes jóvenes (18-55 años, n = 12), que después se extiende a participantes de más edad (Parte II y Parte III). Cabe destacar que el riesgo de (S)AEs relacionados con las vacunas se supone que es similar en cada grupo de edad. Mediante este diseño, los inventores abordan la necesidad médica urgente de protección de sujetos en riesgo de infección grave por SARS-CoV-2 proporcionando datos de seguridad e inmunogenicidad, así como los primeros datos de eficacia en el curso de la infección por SARS-CoV-2 en esta población.
 - La seguridad se monitoriza continuamente mediante un comité de seguimiento de datos y seguridad (DSMB) independiente, que estará provisto de informes sobre una base frecuente.
- 40 Los beneficios clínicos de la vacunación con péptidos en combinación con el ligando XS15 de TLR1/2 en Montanide ISA 51 VG se basan en los siguientes aspectos:
- * La vacunación con péptidos sola rara vez es capaz de inducir respuestas de células T clínicamente eficaces; por lo tanto, la vacuna con péptidos tiene que combinarse con un fármaco adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias.
- 45 * Se ha demostrado que varios ligandos del receptor de tipo Toll (TLR) inducen fuertes respuestas de CD8⁺/ CD4⁺ Th1 en humanos incluyendo CPG (ligando de TLR9), imiquimod (ligando de TLR7) y poli-IC (ligando de TLR3). Sin embargo, para ninguno de estos ligandos de TLR la sustancia GMP está disponible para añadir a una vacuna peptídica.
- 50 * XS15 es un derivado soluble en agua del ligando Pam3Cys de TLR2 e induce una fuerte respuesta de las células T CD8⁺ y CD4⁺Th1 contra péptidos cortos libres emulsionados en Montanide ISA 51 VG después de una única inyección s.c. en voluntarios sanos así como en pacientes.

* Usando XS15, podrían inducirse respuestas inmunitarias para péptidos virales que incluyen péptidos específicos de SARS-CoV-2, neoepítomos de mutaciones específicas de cáncer así como para auto-péptidos asociados a tumores.

*XS15 da como resultado la formación de granuloma en el sitio de vacunación, donde los péptidos vacunados persisten durante al menos 7 semanas, lo que podría soportar la inducción de una respuesta inmunitaria fuerte.

5 *Las respuestas inmunitarias inducidas observadas hasta ahora persistieron durante más de 1,5 años.

*La vacunación con péptidos en combinación con XS15 en Montanide ISA 51 VG ya se ha aplicado en un voluntario sano y pacientes con cáncer. Además de la formación de granuloma localmente en el sitio de la inyección, no se han observado efectos secundarios relevantes, especialmente ninguna reacción alérgica o anafiláctica o síndrome de liberación de citocinas.

10 * Montanide ISA 51 VG es un adyuvante oleoso adecuado para inyección humana que permite la preparación de emulsiones de agua en aceite. Montanide ISA 51 VG se ha usado en más de 200 ensayos clínicos que incluían más de 6000 pacientes y se demostró que era bien tolerado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende péptidos caracterizados por que las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 4, 7, 8, 9 y 10:

ASWFTALTQHGKEDL (SEQ ID NO: 3)
LLLLDRLNQLESKMS (SEQ ID NO: 4)
ITRFQTLALHRSYL (SEQ ID NO: 7)
LSYYKLGASQRVAGD (SEQ ID NO: 8)
FYVYSRVKLNSSRV (SEQ ID NO: 9)
SKWYIRVGARKSAPL (SEQ ID NO: 10).

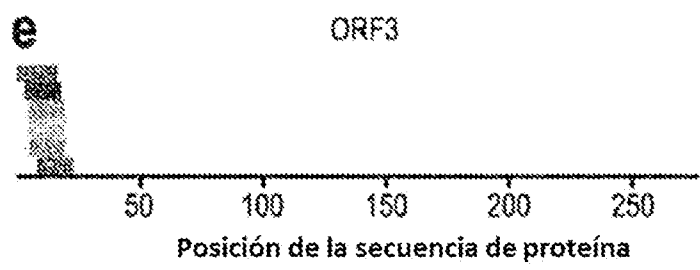
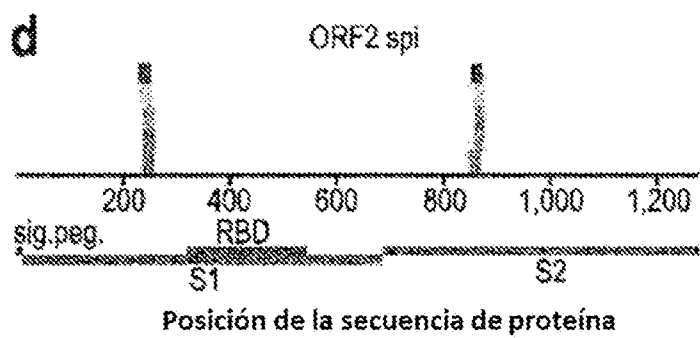
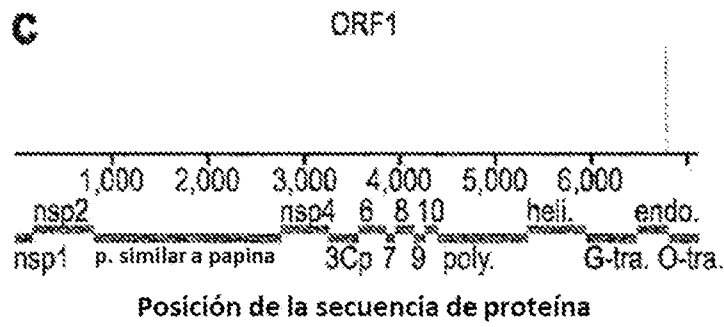
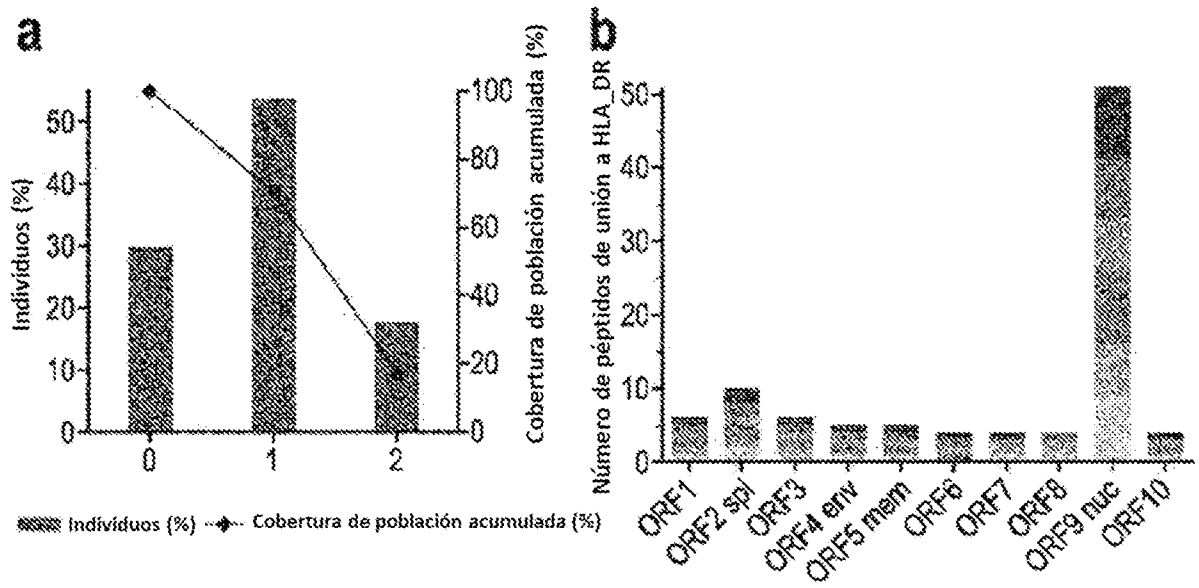
5 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 que comprende péptidos caracterizados por las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 y 10:

KDGIWWATEGALNT (SEQ ID NO: 1)
RWYFYLLGTGPEAGL (SEQ ID NO: 2)
ASWFTALTQHGKEDL (SEQ ID NO: 3)
LLLLDRLNQLESKMS (SEQ ID NO: 4)
ITRFQTLALHRSYL (SEQ ID NO: 7)
LSYYKLGASQRVAGD (SEQ ID NO: 8)
FYVYSRVKLNSSRV (SEQ ID NO: 9)
SKWYIRVGARKSAPL (SEQ ID NO: 10).

3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, que es una vacuna.

10 4. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde comprende adicionalmente un adyuvante.

5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en el ligando de TLR1/2, ligando XS15 de TLR1/2, ligando Pam3Cys de TLR1/2, ligando de TLR9, ligando CpG de TLR9, Montanide ISA 51 VG, y combinaciones de los mismos.



Legend for DRB1* alleles: DRB1*01 (diagonal lines), DRB1*03 (horizontal lines), DRB1*04 (vertical lines), DRB1*07 (cross-hatch), DRB1*11 (stippled), DRB1*15 (solid black).

Fig. 1

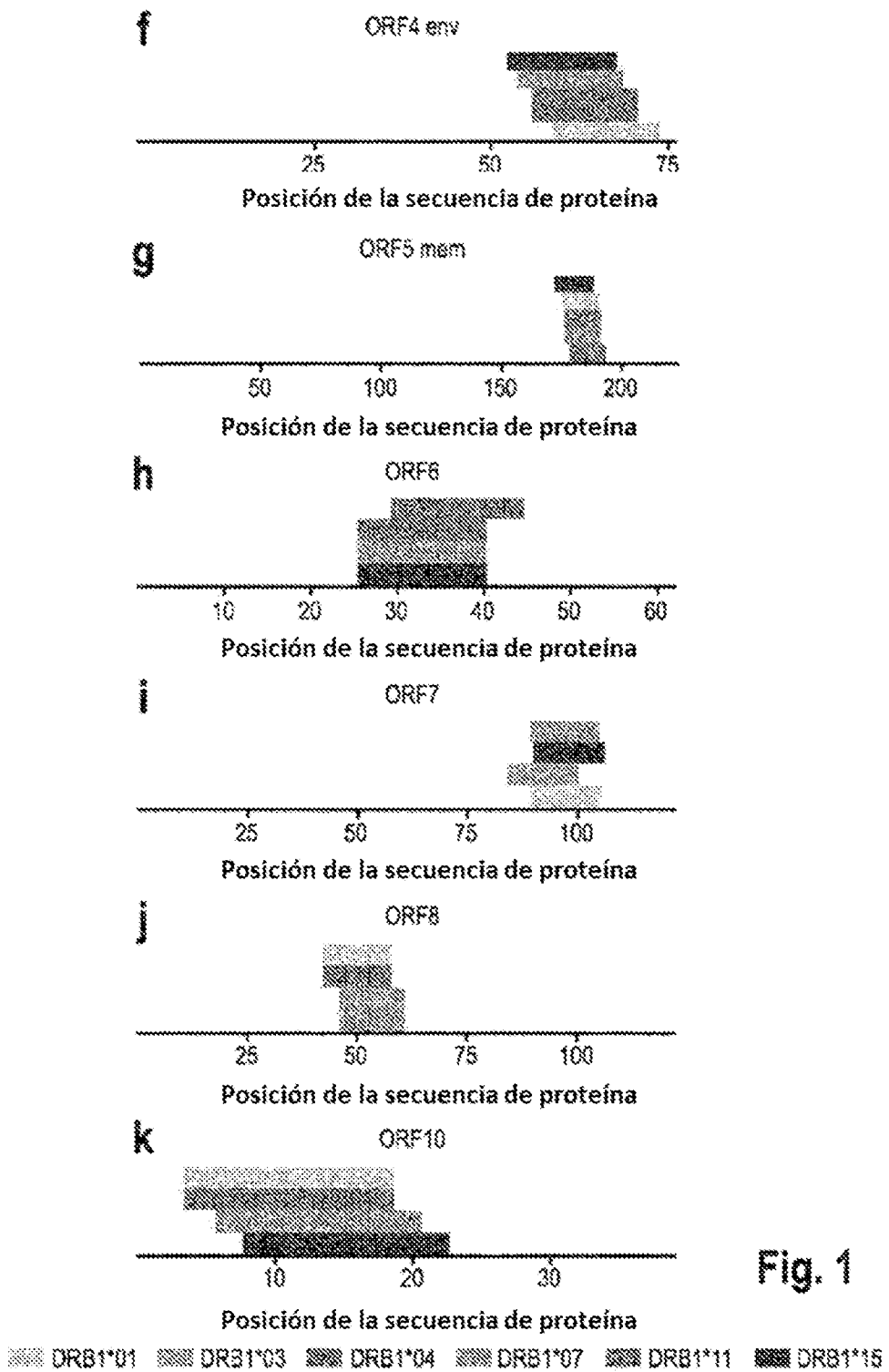


Fig. 1

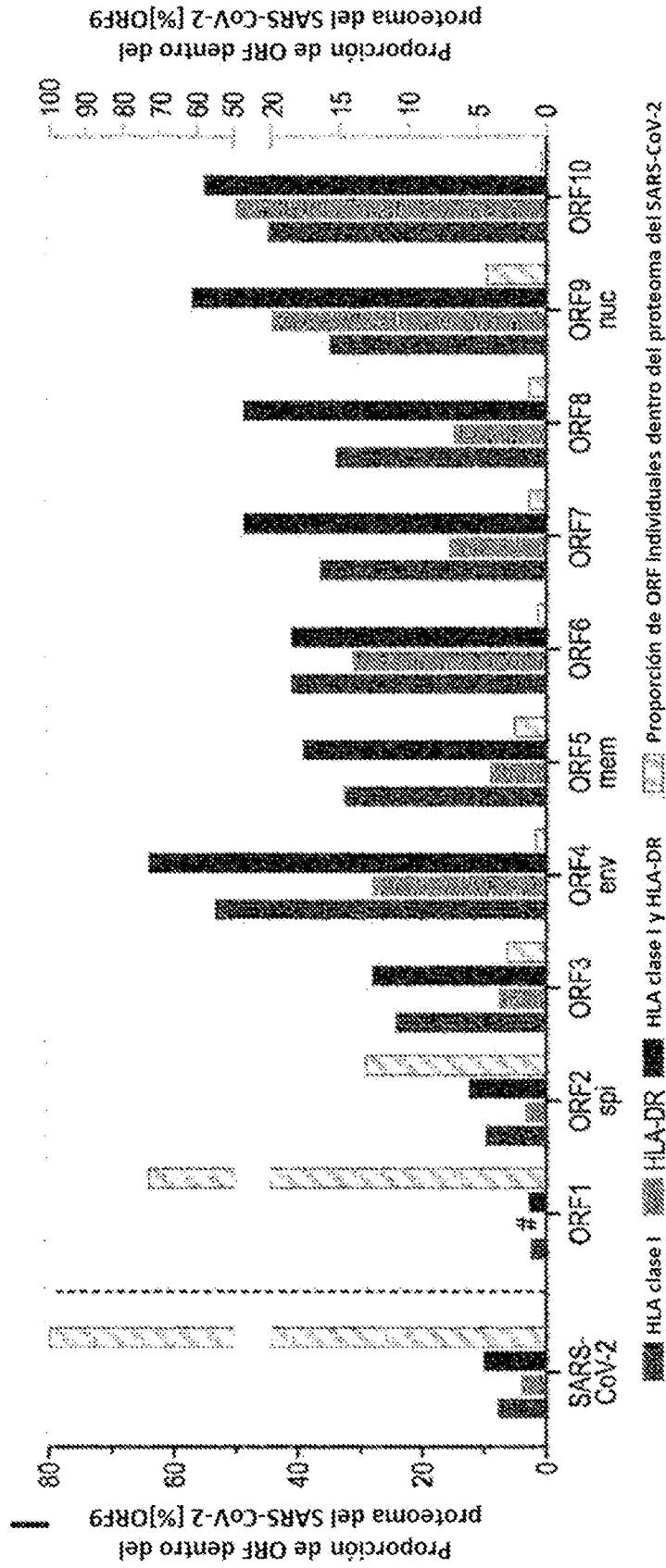


Fig. 1

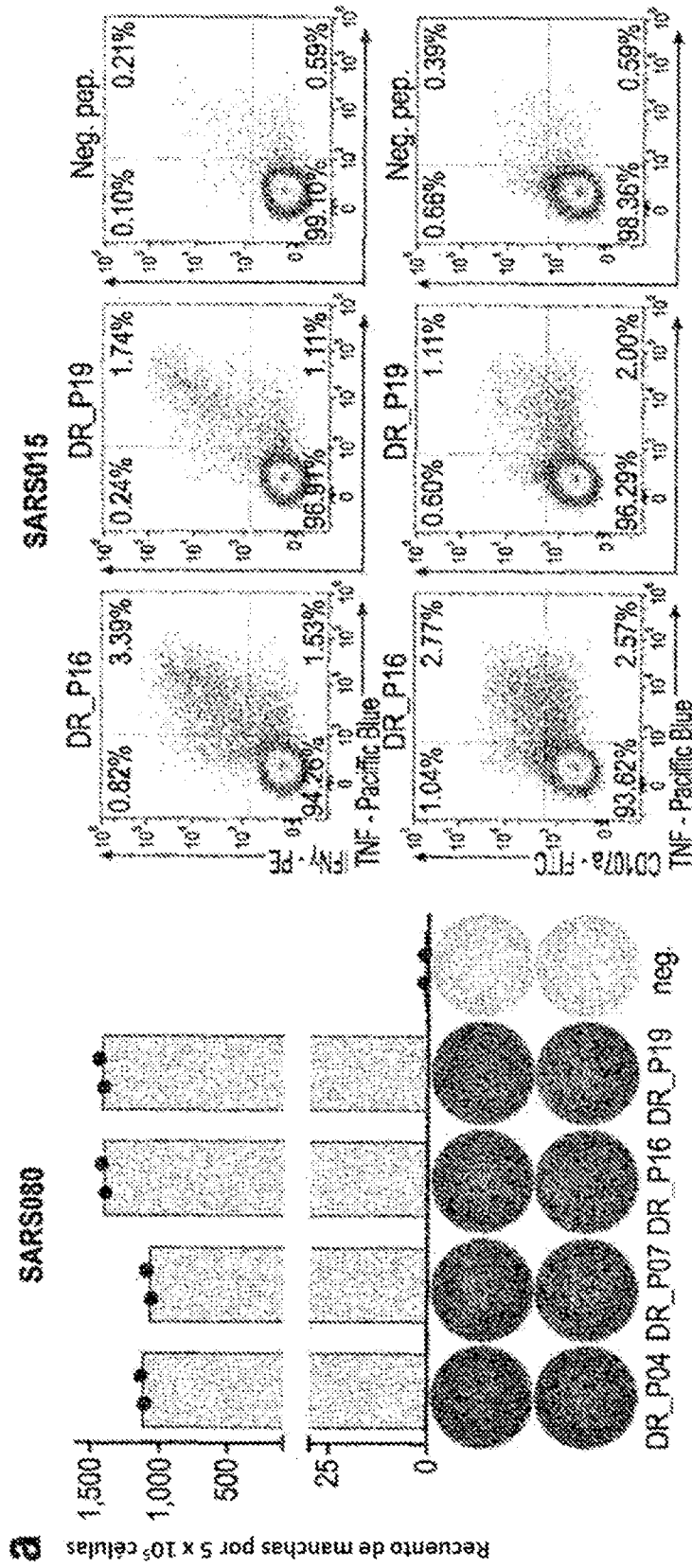


Fig. 2

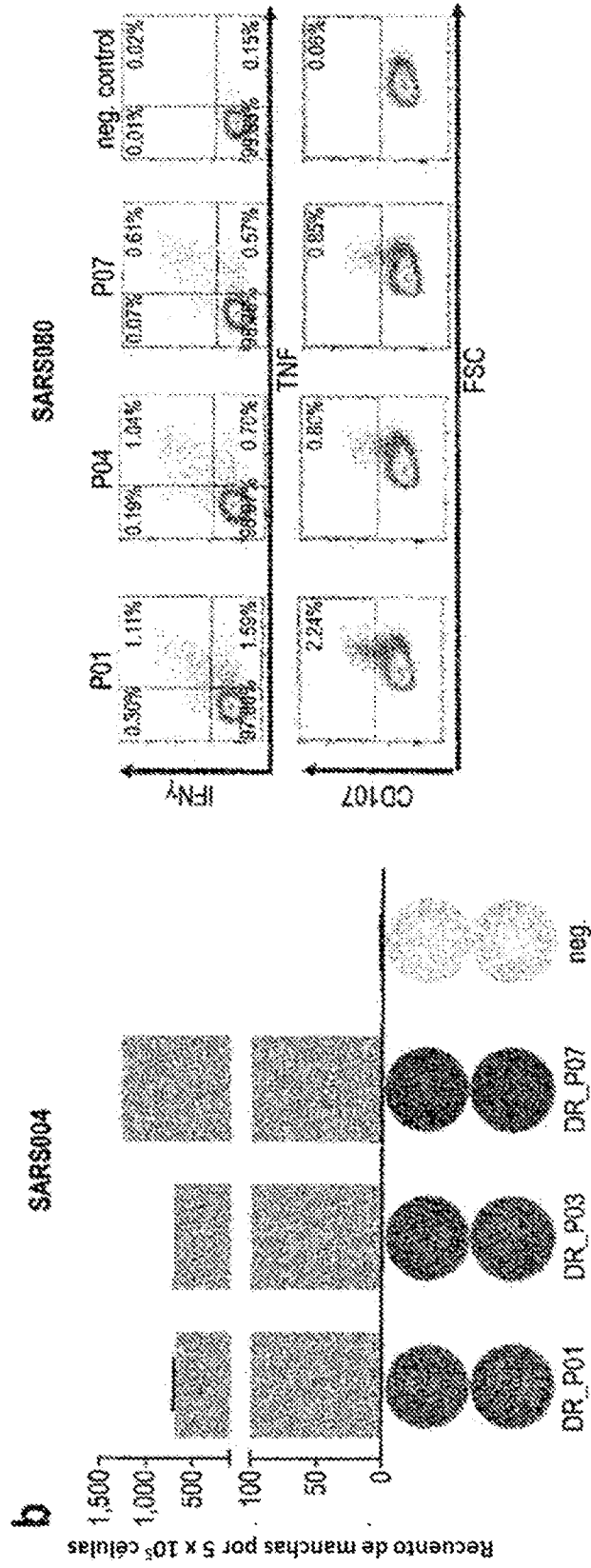


Fig. 2

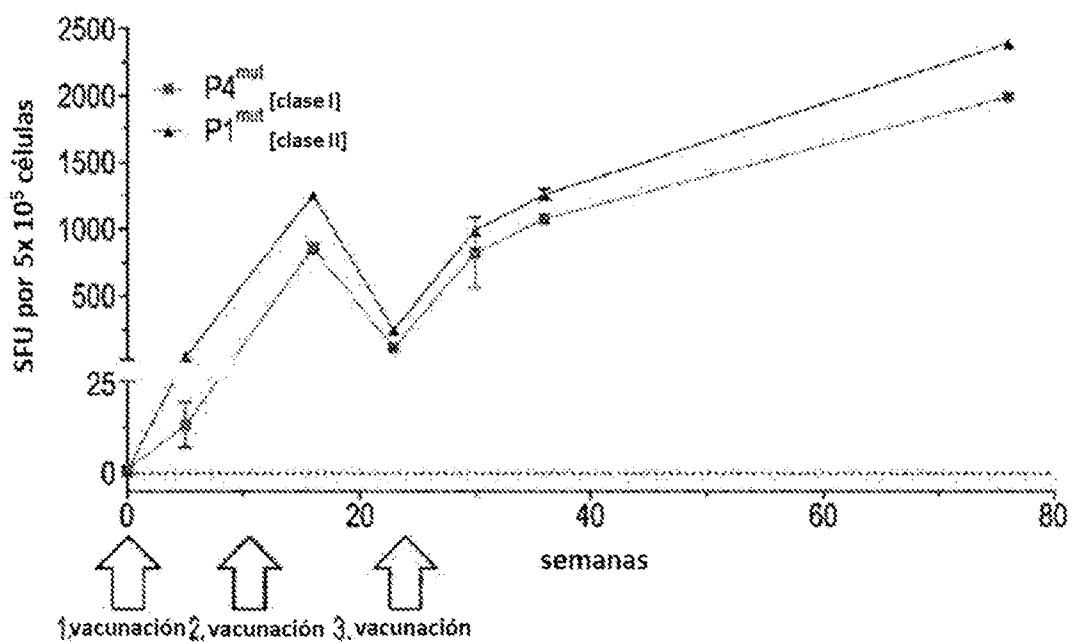


Fig. 3

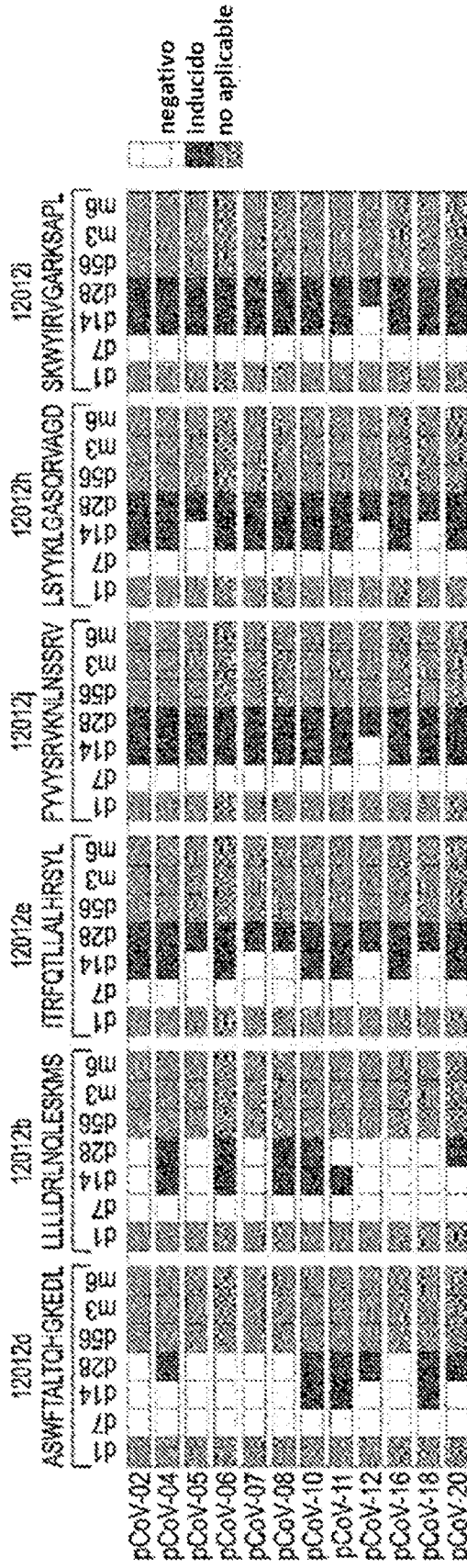


Fig. 4

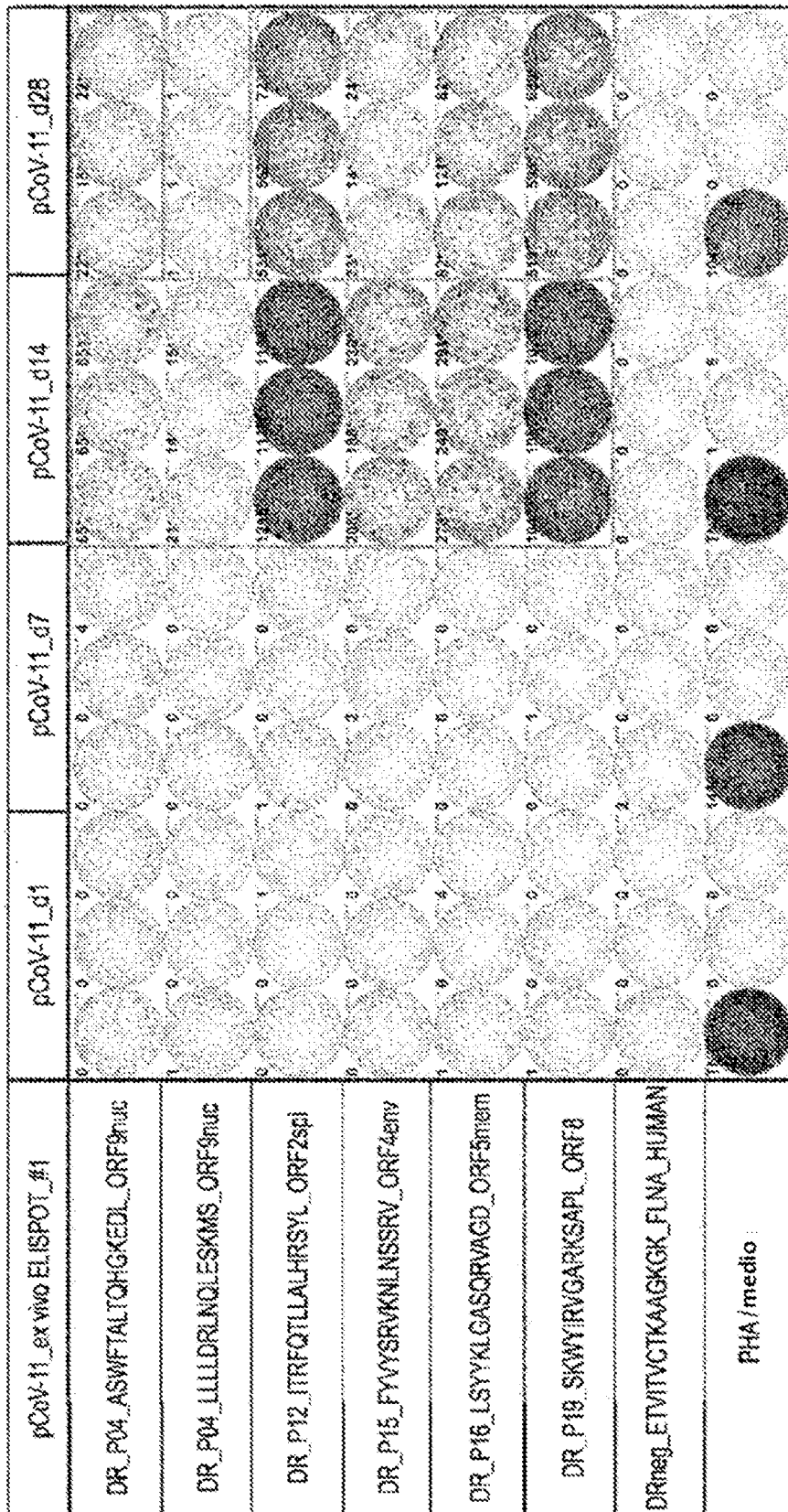


Fig. 5

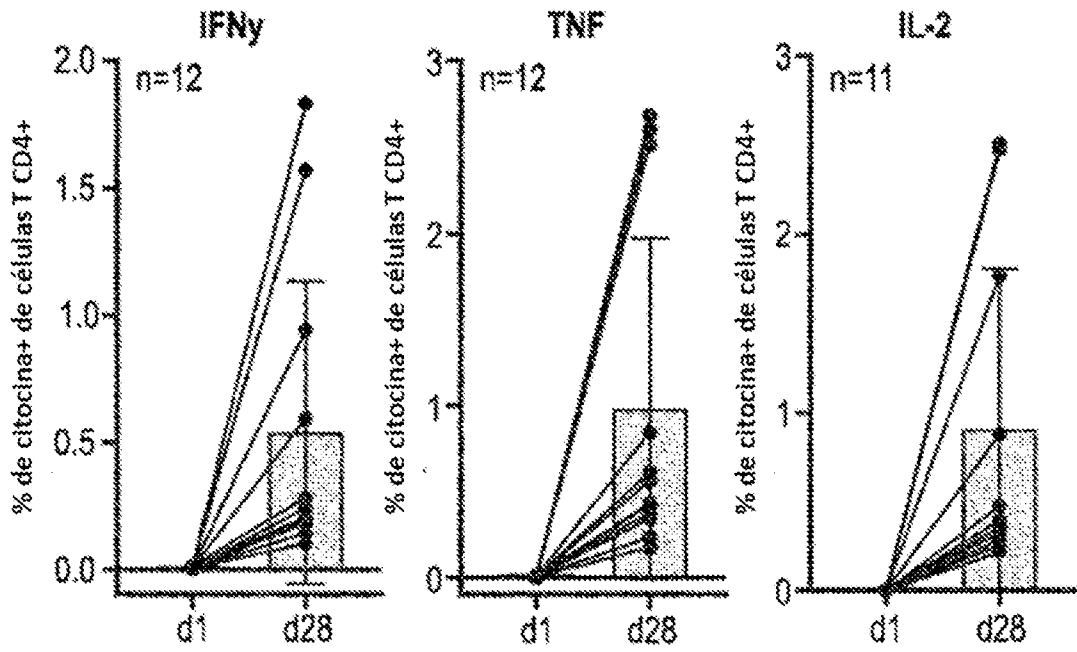


Fig. 6

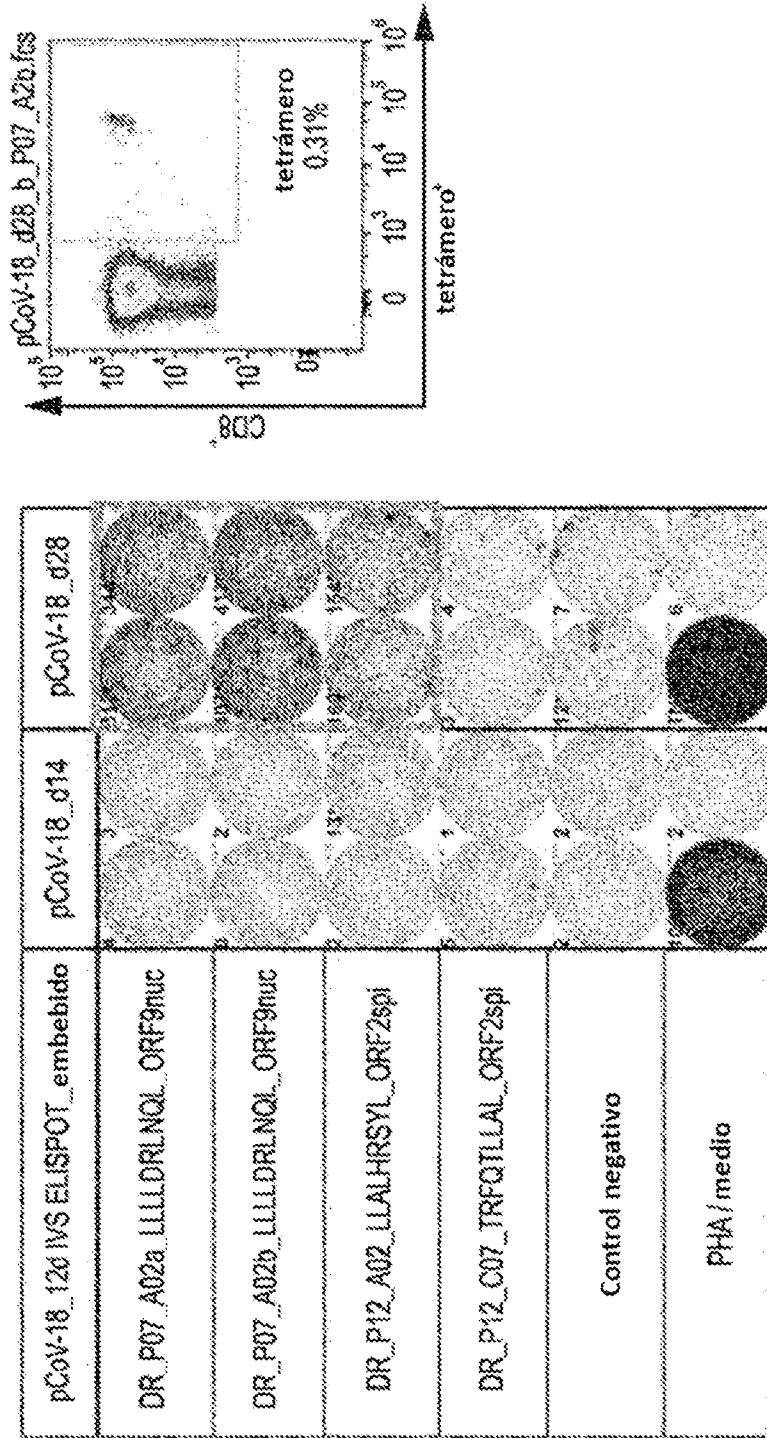


Fig. 7

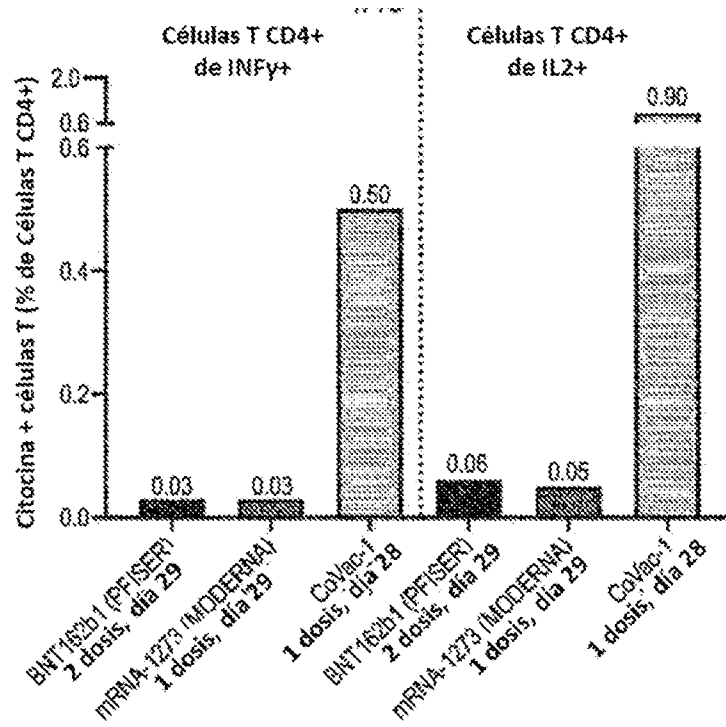


Fig. 8

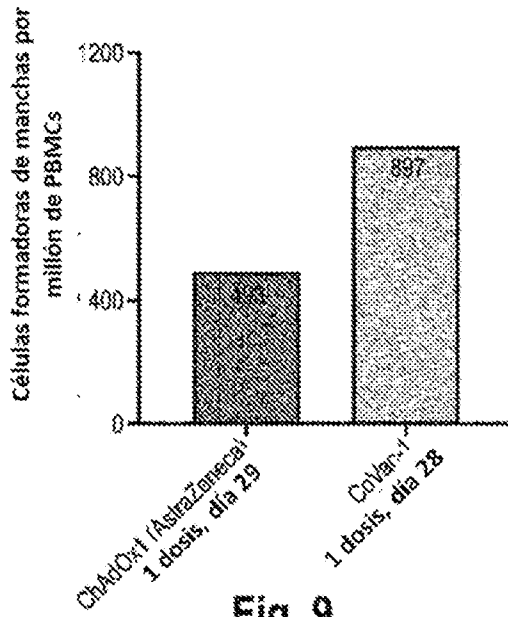


Fig. 9

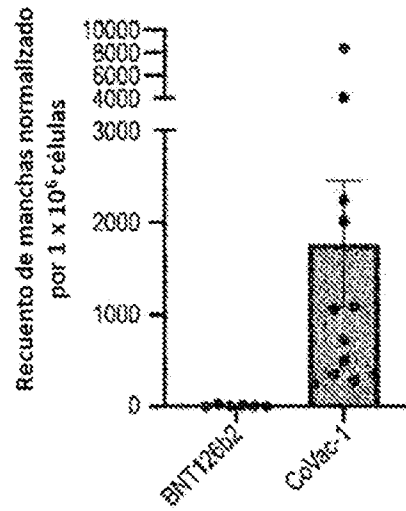


Fig. 10

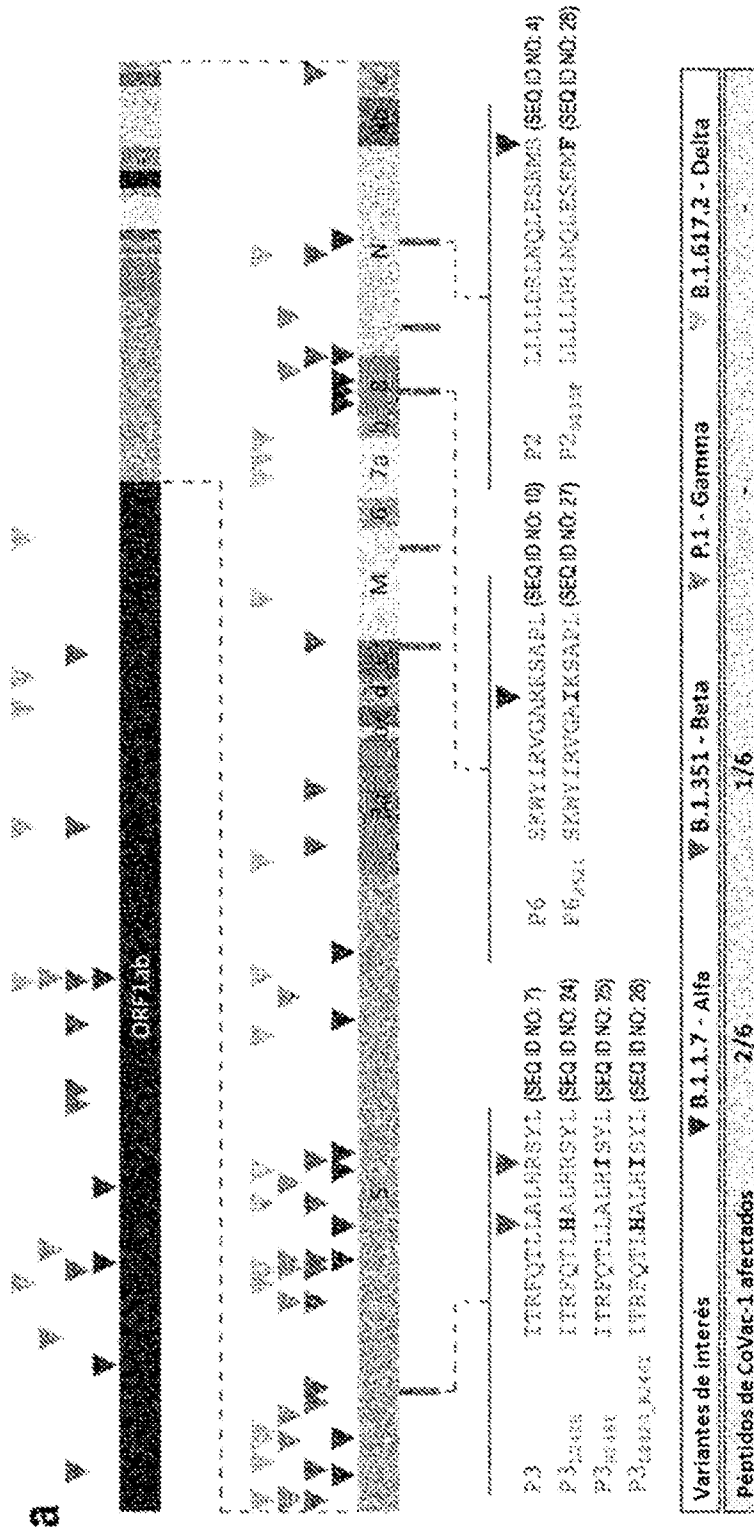


Fig. 11

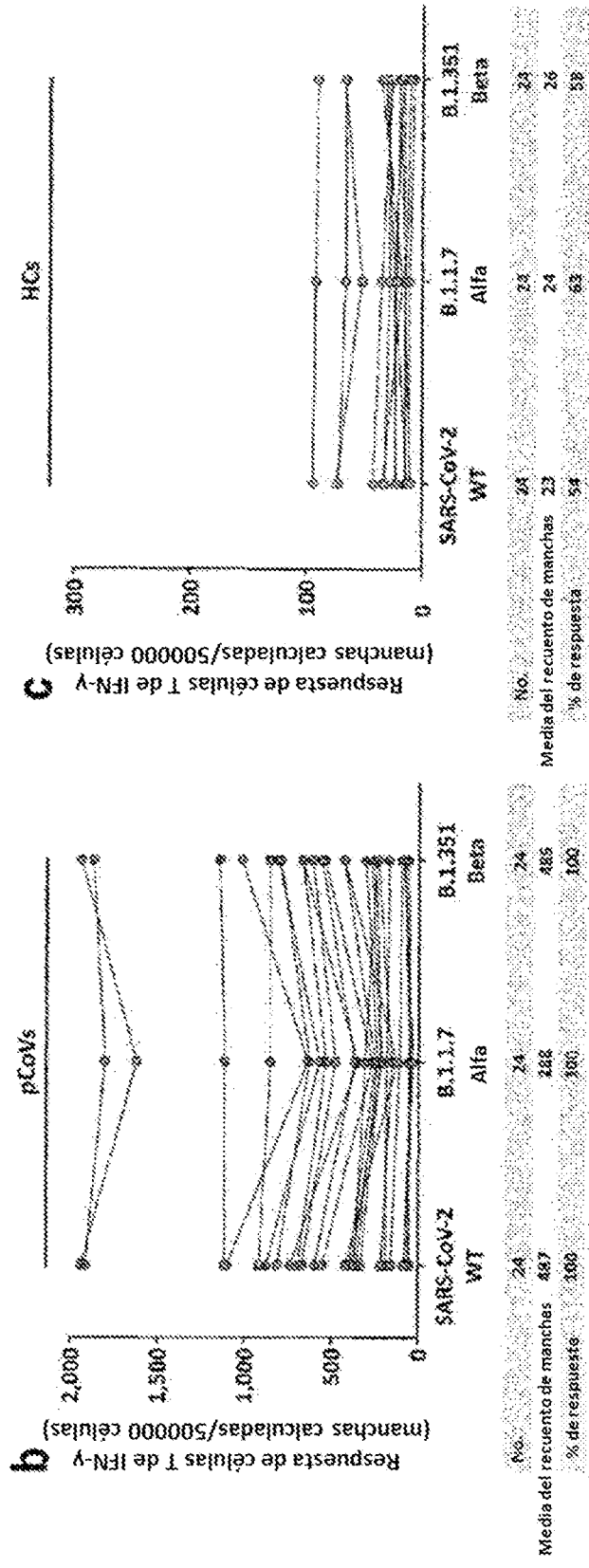


Fig. 11