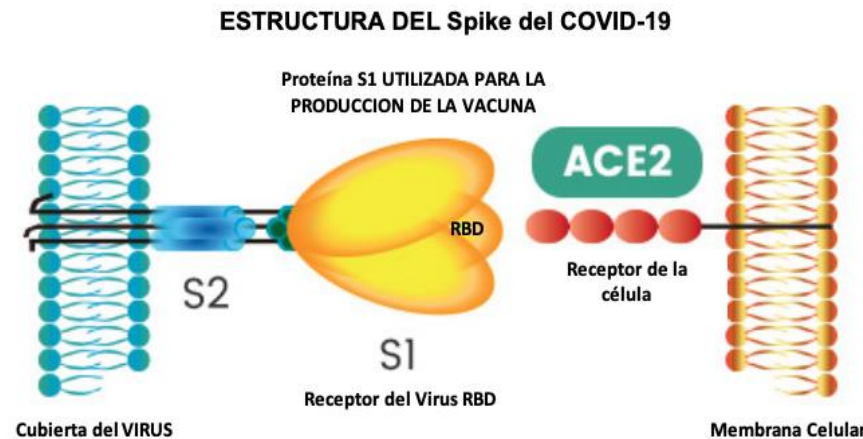
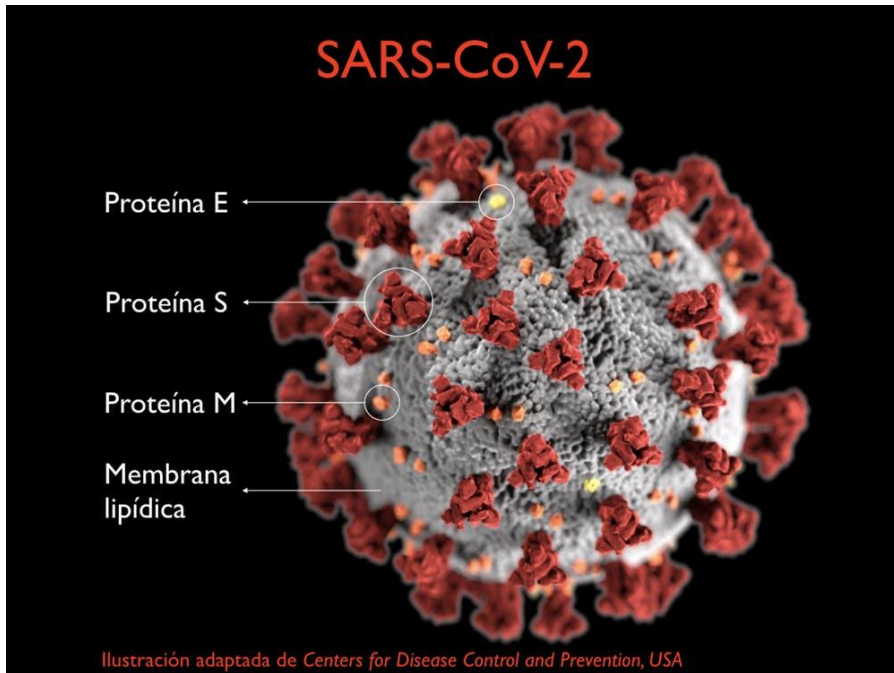


PROYECTO DE LA VACUNA PERUANA PARA EL COVID-19 Y UN TRATAMIENTO DE INUMIZACIÓN PASIVA

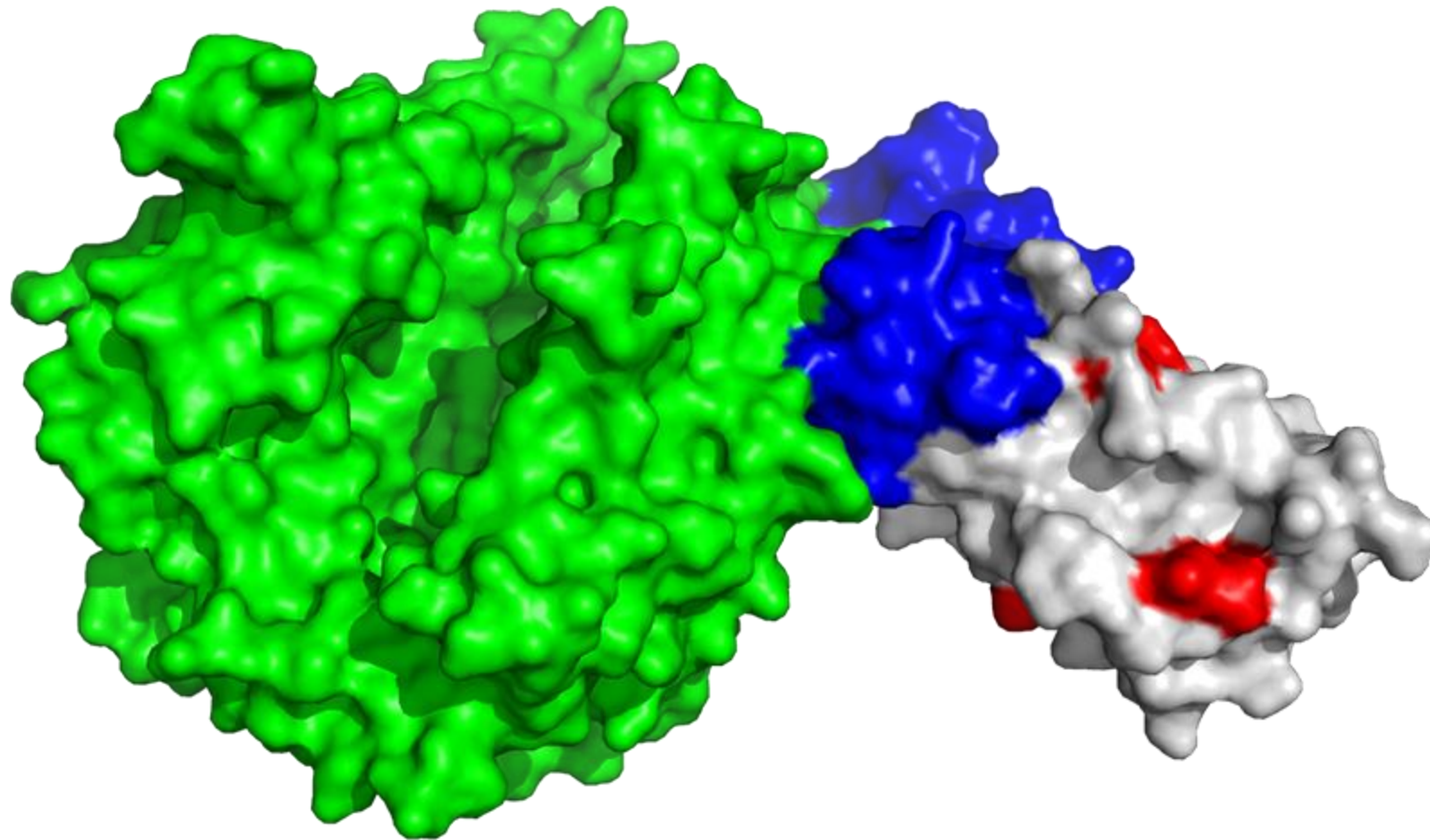


Proteínas de SARS CoV-2 evaluadas como blancos para nuestras vacunas

1. S1-S2
2. S1
3. S1 Trimerizada
4. RBD
5. RBD Dimerizada

El sitio crítico para atacar al virus con anticuerpos neutralizantes es la proteína Spike
La proteína Spike es la “llave de entrada” para ingresar a las células humanas a través del Receptor ACE2

Las vacunas que se vienen desarrollando se basan en el subdominio RBD.

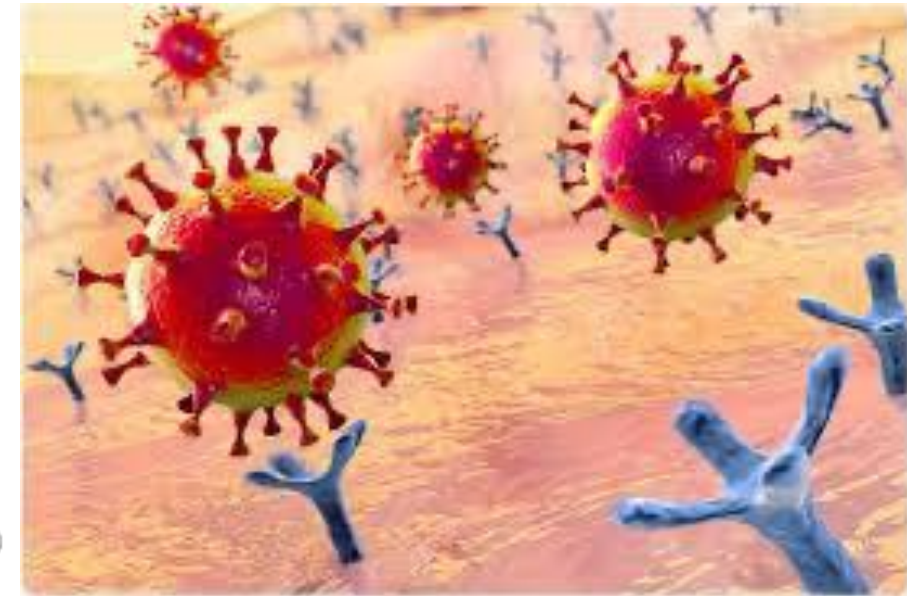


ACE2

RBD

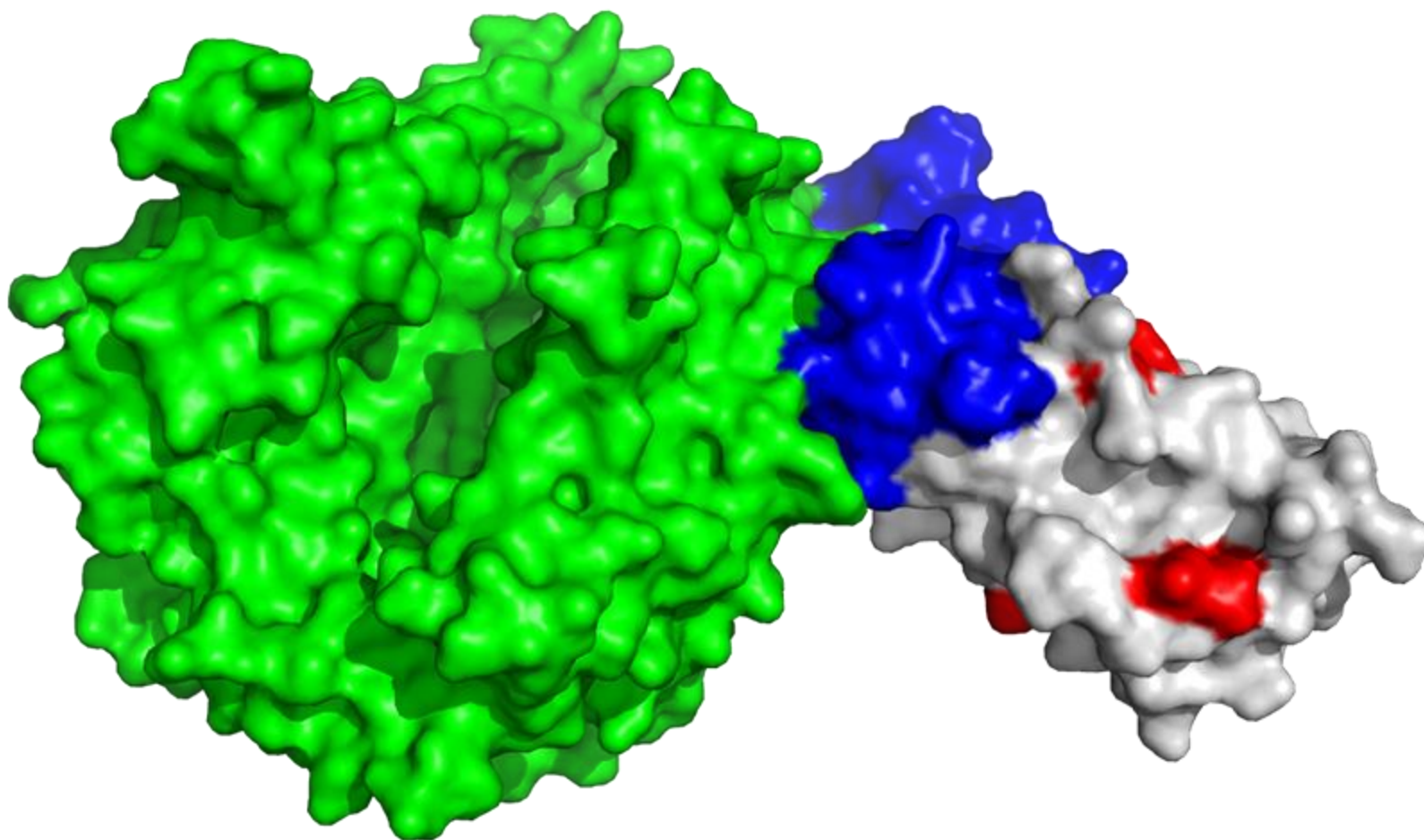
S1

MUTATIONS



Las pruebas iniciales se basaron en RBD S1-monomérico, S1-trimérico, y S2. En todos los casos, RBD fué el antígeno que mostró las respuestas más fuertes y fué este el antígeno que se continuó evaluando

BINDING ENERGY CALCULATIONS: ACE2-S1(RBD)



ACE2

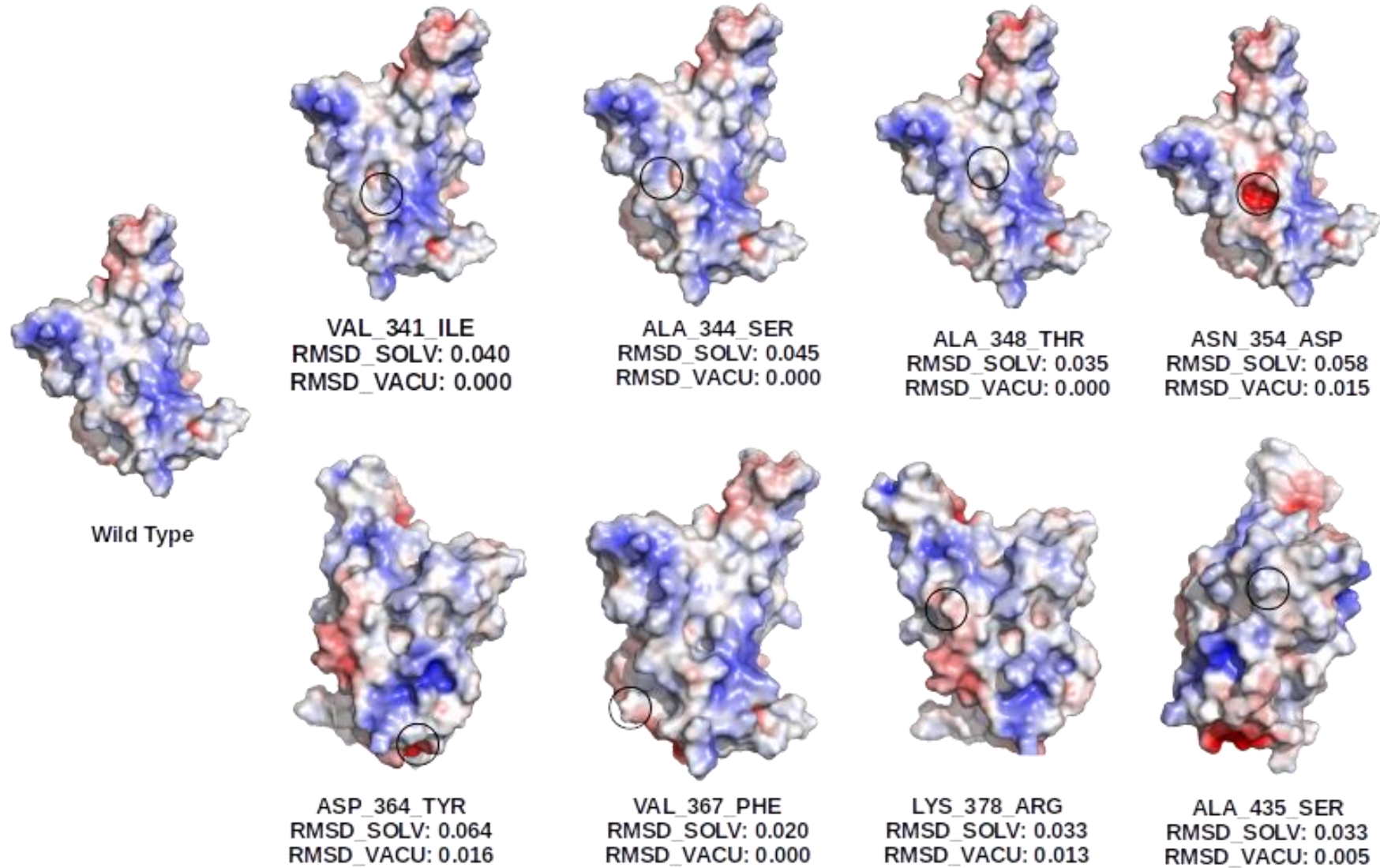
RBD

S1

MUTATION
S

Mutations	Binding affinity (kcal.mol ⁻¹)	Kd (M)
WT	-12.3	9.7 e ⁻¹⁰
341 ILE	-12.3	9.7 e ⁻¹⁰
344 SER	-12.3	8.9 e ⁻¹⁰
348 THR	-12.3	8.9 e ⁻¹⁰
354 ASP	-12.3	1.0 e ⁻¹⁰
364 TYR	-12.3	9.3 e ⁻¹⁰
367 PHE	-12.3	9.7 e ⁻¹⁰
378 ARG	-12.3	9.7e ⁻¹⁰
435 SER	-12.3	9.7 e ⁻¹⁰

MODELLING MUTATION SPIKE-S1

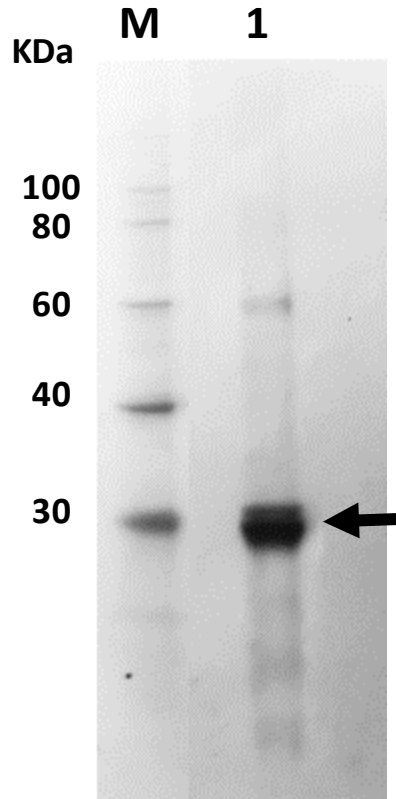


Los 3 tipos de vacuna que se vienen desarrollando

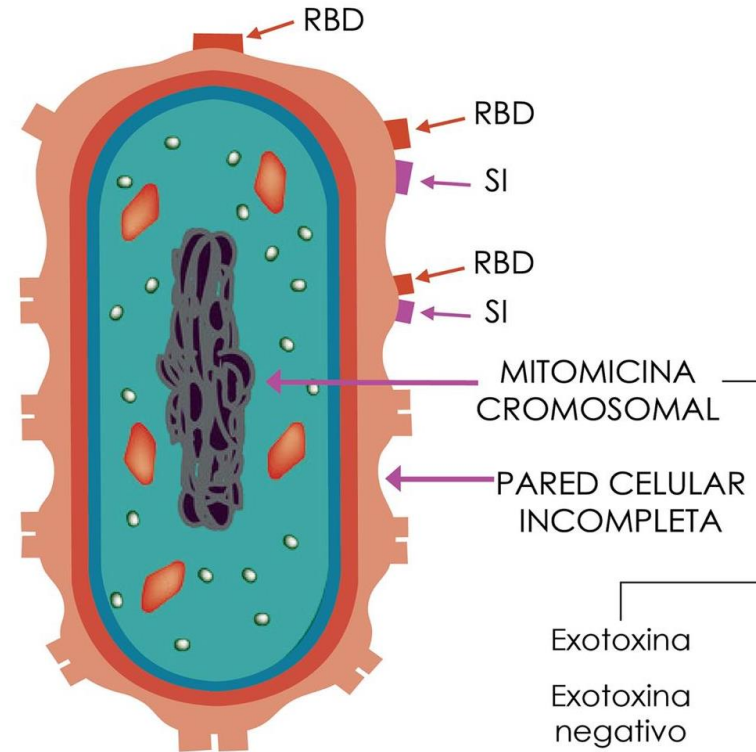
Adicionalmente esta vacuna lleva la flagelina de la Salmonella, la cual es reconocida por ser un potente inmunestimulador



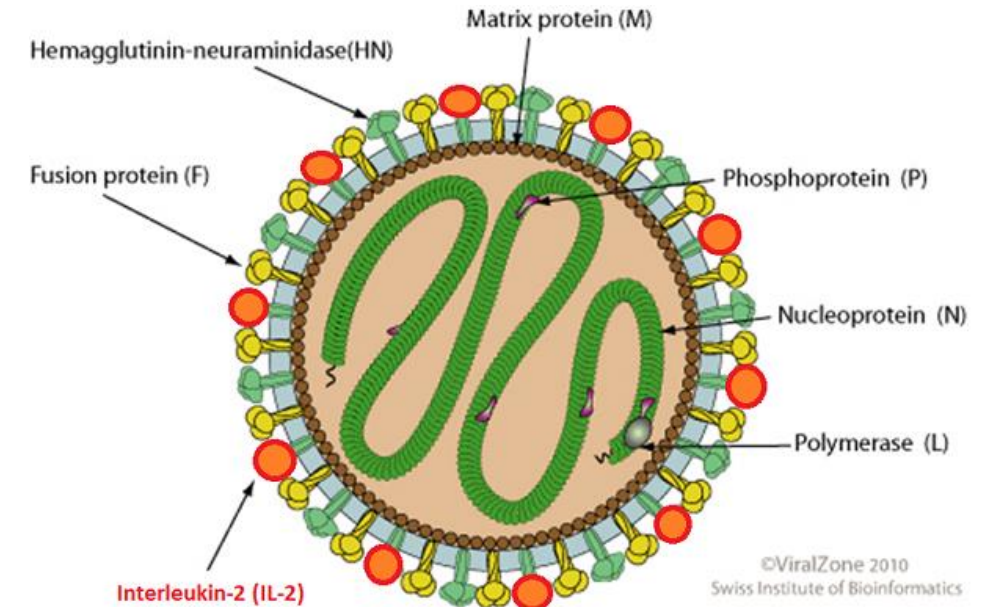
La salmonella es reconocida por inducer una respuesta Th1 y una baja respuesta Th2. Esto es importante para reducir el riesgo de exaceración de la respuesta inflamatoria



Proteína RBD “pura” expresada en células Sf9 – baculovirus purificada y combinada con un adyuvante



Salmonella genéticamente modificada (no-patógena por doble Mutación) expresando RBD en la superficie (Patente FARVET)



Virus de Newcastle genéticamente modificado expresando RBD en la superficie (Patente FARVET)

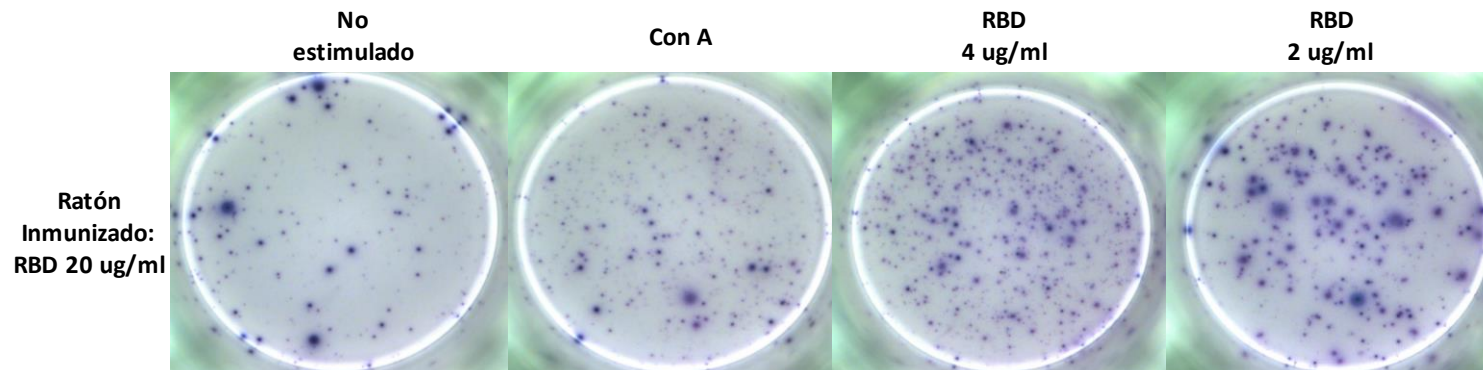
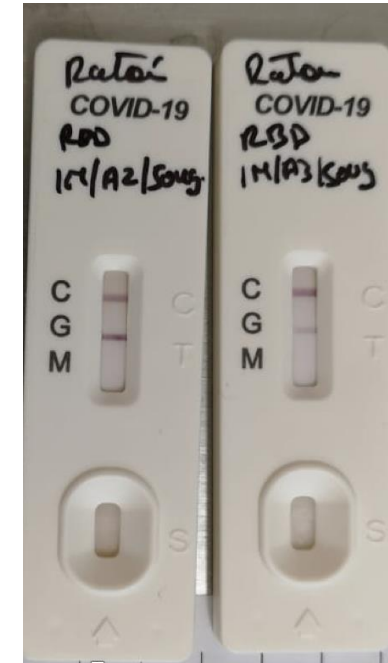
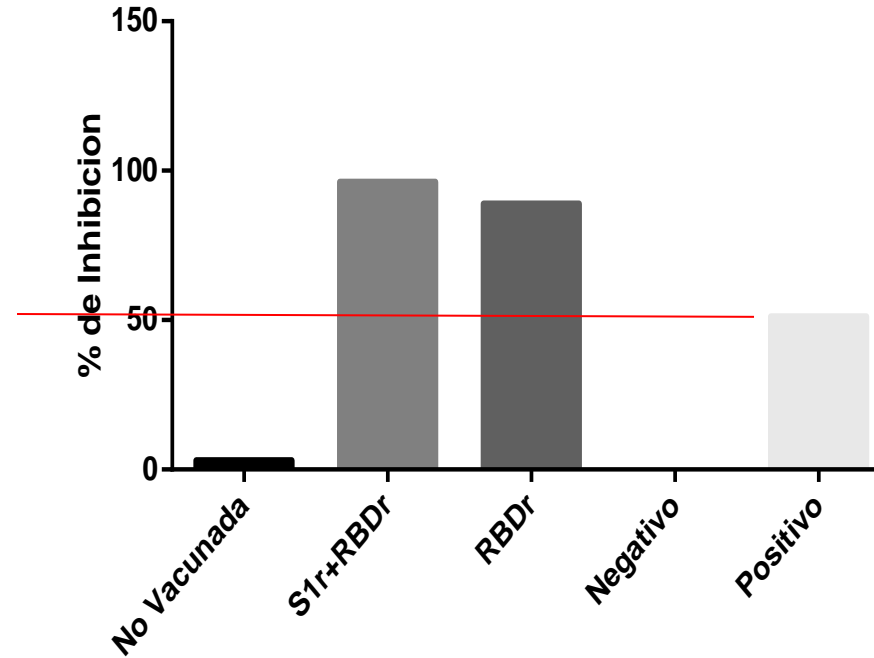
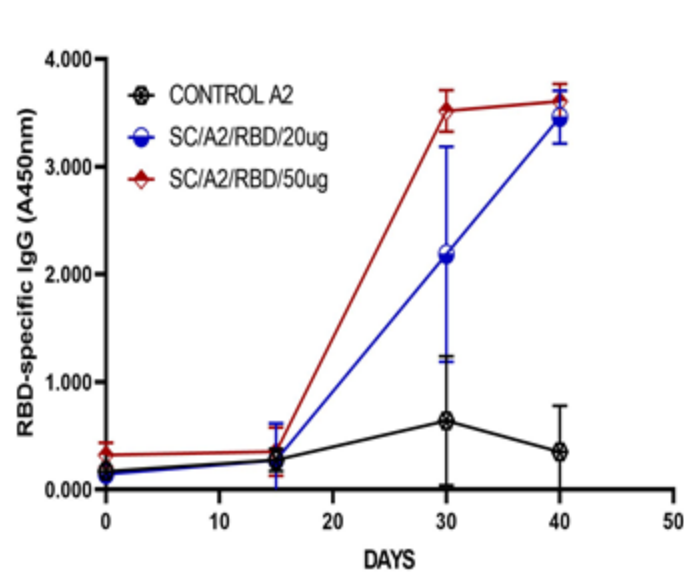
De las 3 vacunas, al momento se han evaluado más ampliamente la proteína RBD recombinante y la salmonella enteritidis modificada que lleva la proteína RBD en su superficie.

Esta evaluación se ha realizado en:

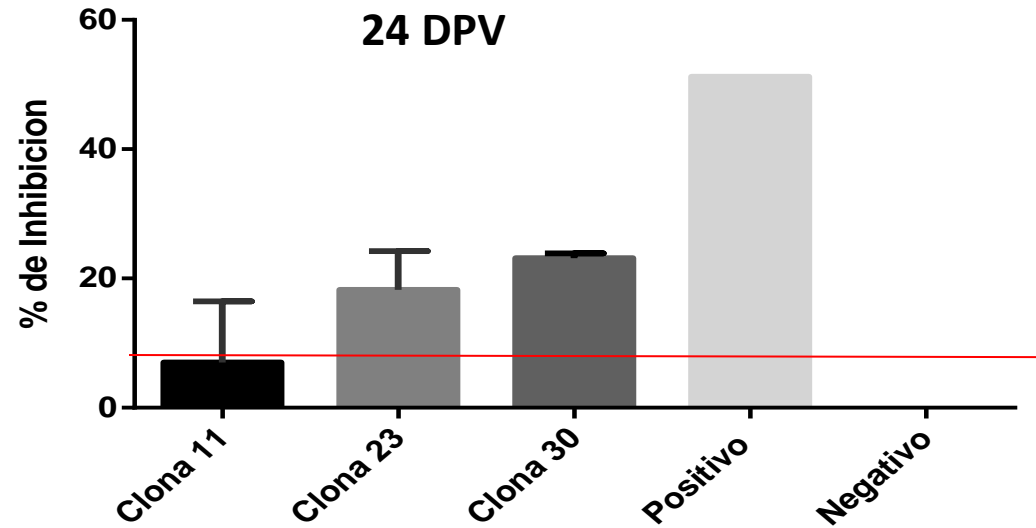
- Ratones
- Conejos
- Gallinas
- Alpacas
- Monos aotus

Los ensayos en Conejos, gallinas y alpacas, se orientaron a evaluar mayormente la seguridad y la capacidad de elicitar anticuerpos IgG.

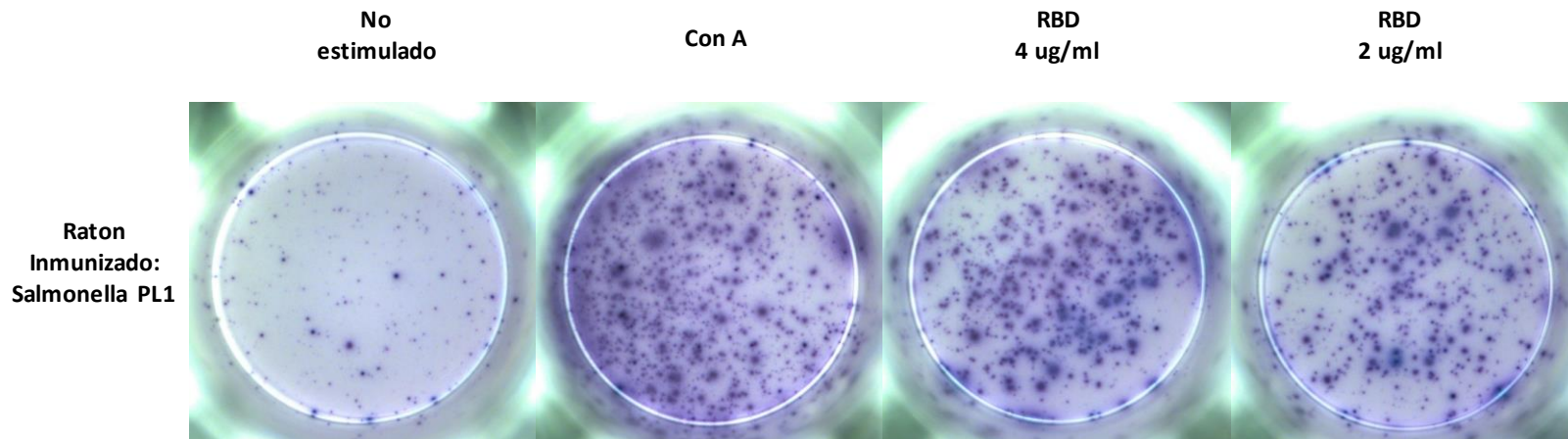
Evidencia de presencia de inmunidad humoral y celular en ratones inmunizados con la vacuna de Proteína RBD recombinante



Evidencia de presencia de inmunidad humoral y celular en ratones inmunizados con la vacuna de Salmonella

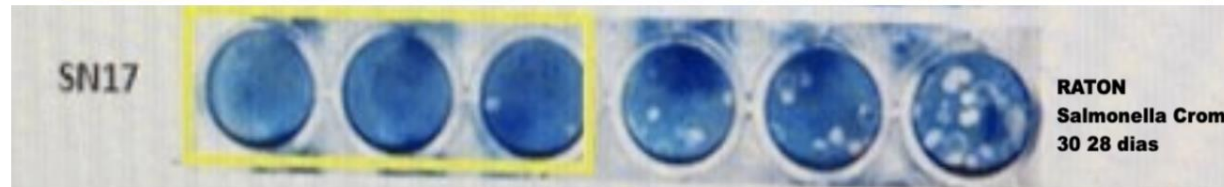
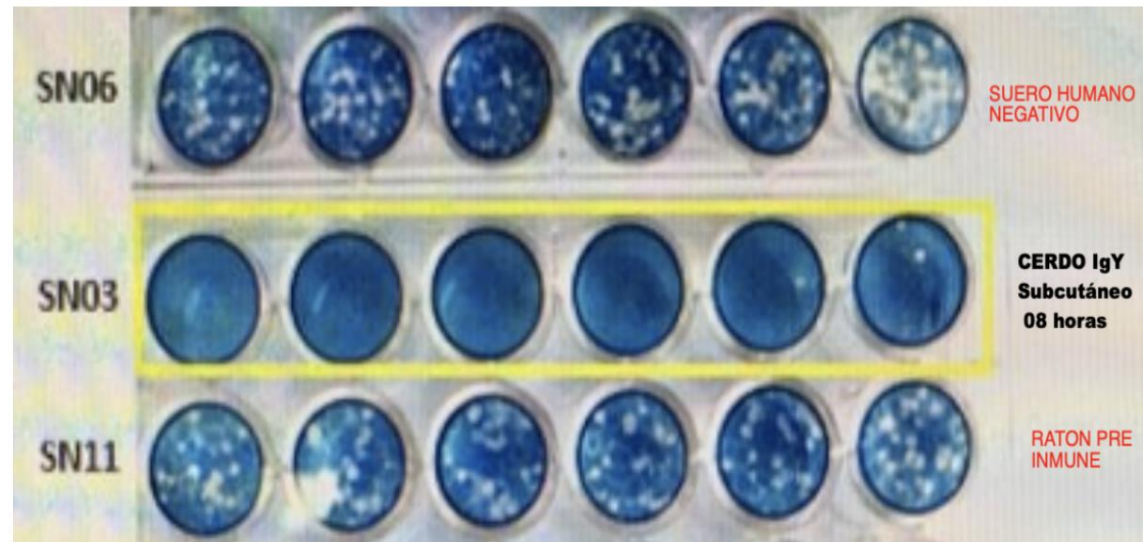


EL SUERO DE RATONES INMUNIZADOS CON SALMONELLA-RBD HA MOSTRADO CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS EN CULTIVOS CELULARES



Detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus SARS-CoV-2 por PRNT

1/20 1/40 1/80 1/160 1/320 1/640





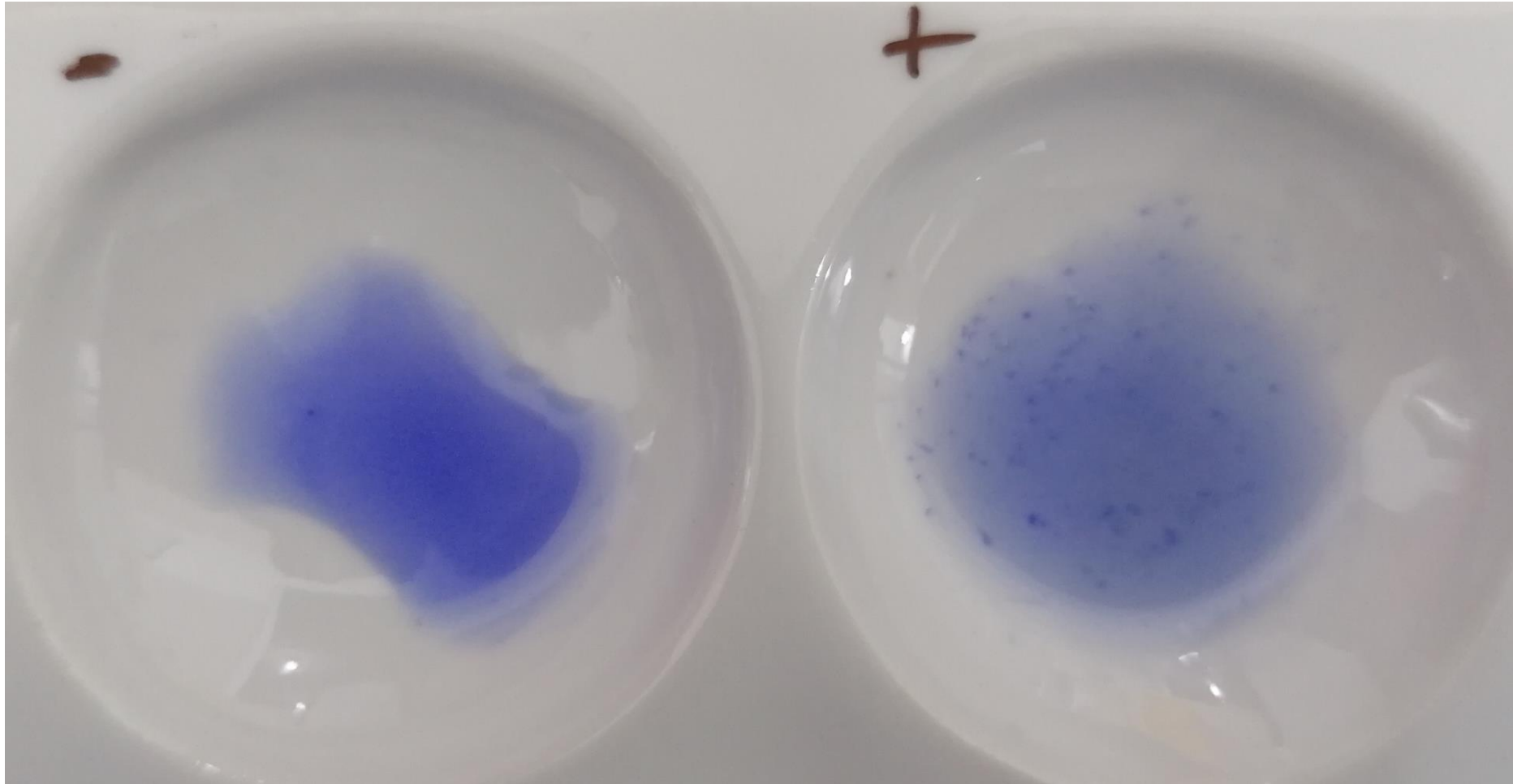
Monos AOTUS, que de
Preferencia deberían ser
MACACOS RHESUS



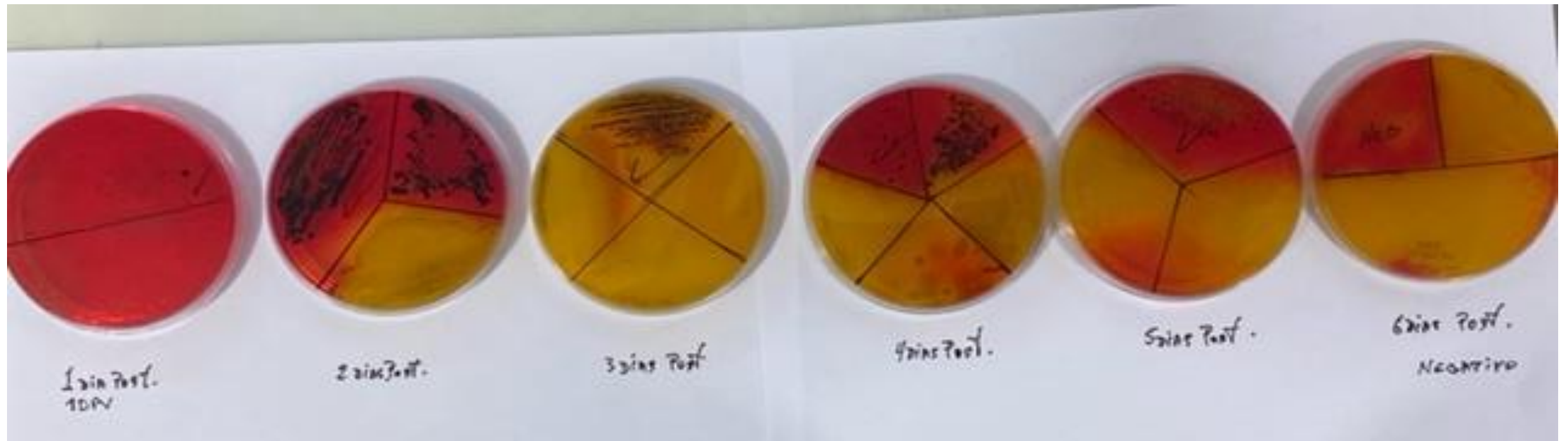
Transporte de los monos en
Jaulas/cajas especiales



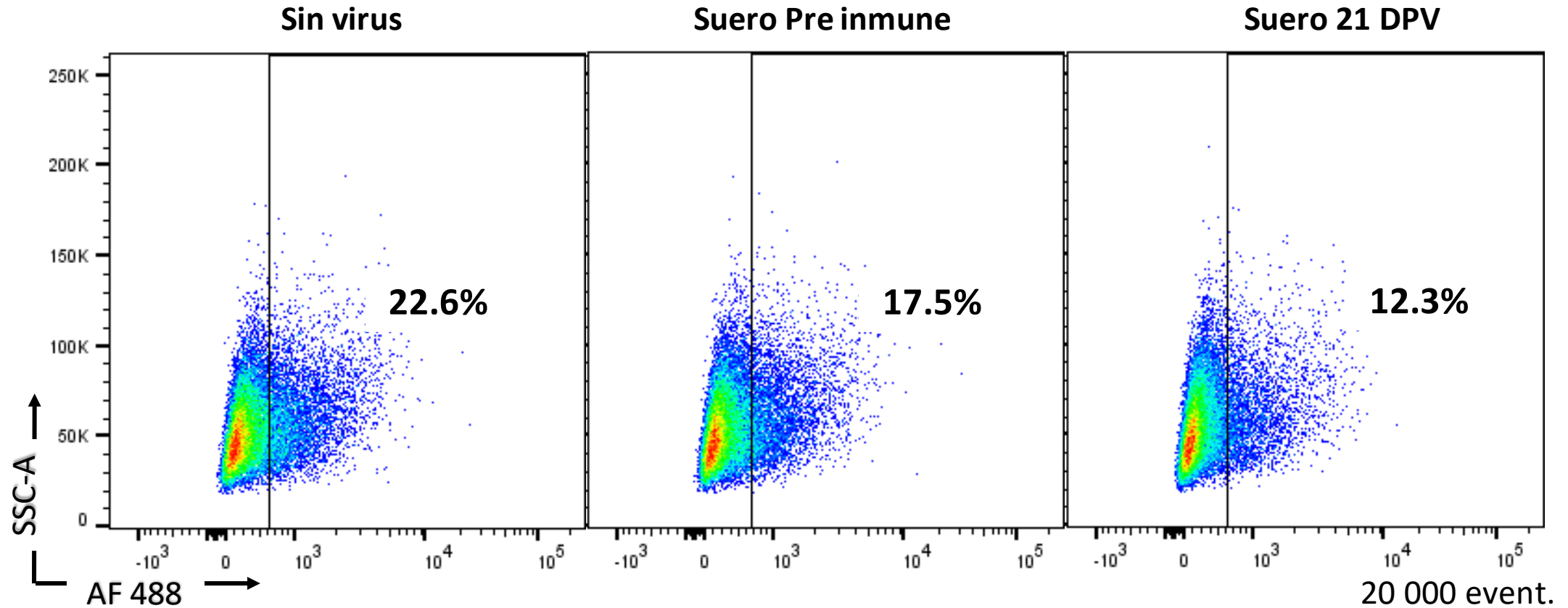
Prueba de aglutinación rápida para detectar anticuerpos COVID 19 con Salmonella modificada en monos Aotus vacunados (21 días post-inmunización)



Detección de Salmonella RBD en heces monos inmunizados con la vacuna de salmonella: Los monos dejan de excretar la salmonella al día 6



El suero de los monos inmunizados con la Salmonella-RBD (SARS COV-2), muestra capacidad de neutralizar la proteína viral RBD (ensayo de citometría)



Tratamiento	Sin virus	Pre Inmune	Salmonella 21 DPV
Bloqueo	-	0 %	29.7%

Evaluación preliminar en primates no-humanos (monos Aotus) con la vacuna de salmonella

- Administración intramuscular vacuna recombinante RBD-A3 (50ug)
- Administración oral vacuna salmonella (10mL)

Resultados:

- .Evidencia de SEGURIDAD de ambas vacunas (estado general de salud BUENO)
- .Detección de anticuerpos anti-RBD a los 15 días
- .Los animales dejan de secretar la salmonella en las heces a los 5 días después de la vacunación

Ventajas de la vacuna de Salmonella-RBD

- La vacuna ha demostrado ser segura en los distintos modelos animales
- Antecedentes de haber sido usada en +500,000 cerdos para controlar el circovirus porcino
- Capacidad de levantar respuesta humoral (IgM, IgG)
- Capacidad de levantar respuesta celular (linfocitos T CD4 – interferon gama)
- Capacidad de neutralizar la proteína viral in-vitro
- Capacidad de sero-neutralización del virus SARS-CoV-2 (colaboración INS)
- Facilidad y velocidad de producción (30 millones de dosis cada 15 días en las actuales condiciones y facilidades)
- Es de administración por vía oral (no va a requerir de un ejército de técnicos para inmunizar). Podrían participar promotores comunitarios.
- Facilidad para cambiar el antígeno en un función de las mutaciones mas prevalentes
- Importante estabilidad (al menos 15 días a 4C)
- Bajo costo de producción (S/ 5-10 Soles por dosis)

Antecedentes de vacunas de salmonella

Revista Internacional de Microbiología Médica
Volumen 299, Número 4, abril de 2009, páginas 233-246

Estabilidad genética de la cepa vacunal *Salmonella* Typhi Ty21a durante 25 años

Dennis J. Kopecko^a, Heike Sieber^b, Jose A. Ures^b, Andreas Fürer^b, Jacqueline Schlup^b, Ulrich Knof^b, Andre Collioud^b, DeQi Xu^a, Kevin Colburn^a, Guido Dietrich^b 

Mostrar más 

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.09.003>

Obtén derechos y contenido

Resumen

La cepa de **vacuna bacteriana** viva atenuada *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty21a es el componente principal de Vivotif, la única vacuna oral autorizada contra la **fiebre tifoidea**. La cepa se desarrolló en la década de 1970 mediante **mutagénesis** química. En el curso de esta mutagénesis, se introdujeron varias mutaciones en la cepa de la vacuna. La caracterización de la cepa de la vacuna durante el desarrollo, así como la liberación de lotes de siembra maestra y de trabajo (MSL y WSL) y lotes comerciales, se basa en ensayos fenotípicos que evalúan las características microbiológicas y bioquímicas de Ty21a. En el estudio actual, hemos analizado mediante **secuenciación de ADN** las mutaciones específicas se correlacionaron originalmente con la atenuación de la cepa Ty21a. Estos datos demuestran la estabilidad de estas mutaciones

4/9/2020 Recomendaciones actualizadas para el uso de la vacuna contra la fiebre tifoidea - Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización, Estados Unidos, ...



Informe semanal de morbilidad y mortalidad (*MMWR*)

Recomendaciones actualizadas para el uso de la vacuna contra la fiebre tifoidea - Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización, Estados Unidos, 2015

Semanal

27 de marzo de 2015/64 (11); 305-308

Brendan R. Jackson, MD¹, Shahed Iqbal, PhD², Barbara Mahon, MD¹ (afiliaciones de los autores al final del texto)

Estas recomendaciones revisadas del Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización actualizan las recomendaciones publicadas en *MMWR* en 1994 (*1*) e incluyen información actualizada sobre las dos vacunas actualmente disponibles y sobre la seguridad de las vacunas. También incluyen una actualización sobre la epidemiología de la fiebre entérica en los Estados Unidos, centrada en el aumento de la resistencia a los medicamentos en *Salmonella enterica* serotipo Typhi, la causa de la fiebre tifoidea, así como la aparición de *Salmonella* serotipo Paratyphi A, una causa de la fiebre paratifoidea, contra la cual las vacunas contra la fiebre tifoidea ofrecen poca o ninguna protección.

Introducción

Los serotipos de *Salmonella enterica* Typhi y Paratyphi A, Paratyphi B (tartrato negativo) y Paratyphi C causan una enfermedad bacteriémica prolongada denominada fiebre tifoidea y paratifoidea, respectivamente, y en conjunto fiebre entérica. La fiebre entérica puede ser grave e incluso poner en peligro la vida. Se adquiere

The Journal of
Infectious Diseases

J Infect Dis. 2016 1 de junio; 213 (11): 1809–1819.

Publicado en línea el 24 de enero de 2016. doi: [10.1093/infdis/jiw030](https://doi.org/10.1093/infdis/jiw030)

PMCID: PMC4857474

PMID: [26810369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26810369/)

La vacunación oral contra la fiebre tifoidea con la cepa Ty21a de *Salmonella* Typhi atenuada en vivo genera células T CD4⁺ y CD8⁺ que responden a Ty21a y que responden al virus de la influenza heterólogo en la mucosa intestinal humana

Shaun H. Pennington^{1,2}, Ameeka L. Thompson^{1,2}, Adam KA Wright¹, Daniela M. Ferreira², Kondwani C. Jambo², Angela D. Wright², Brian Faragher², Jill W. Gilmour³, Stephen B. Gordon², y Melita A. Gordon¹

¹Department of Clinical Infection, Microbiology, and Immunology, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool

²Department of Clinical Sciences, Liverpool School of Tropical Medicine

³International AIDS Vaccine Initiative, Human Immunology Laboratory, Imperial College, London, United Kingdom

Correspondence: M. A. Gordon, Department of Clinical Infection, Microbiology and Immunology, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, UK (magordon@liverpool.ac.uk).

Received 2015 Sep 11; Accepted 2016 Jan 6.

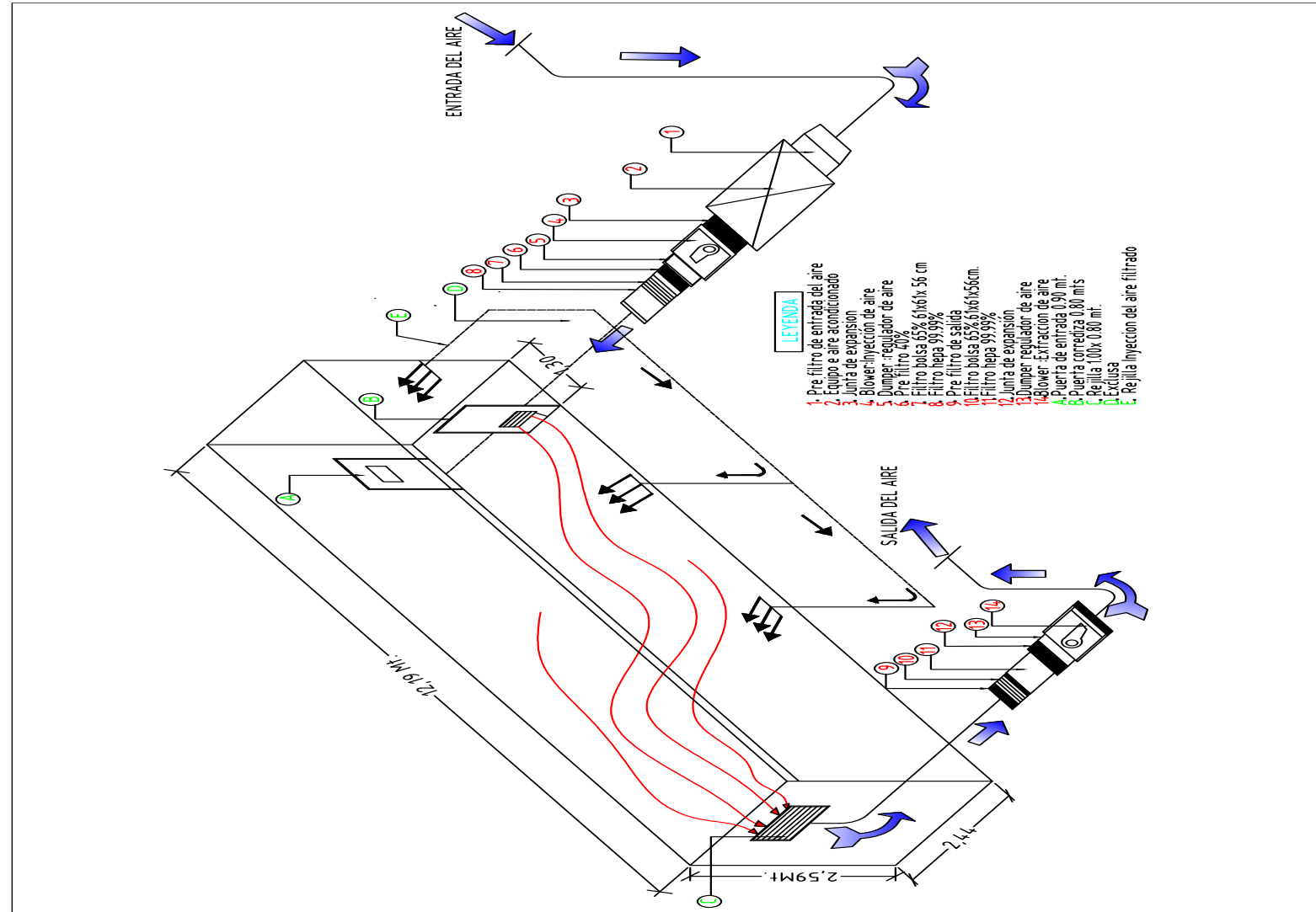
Copyright © The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America.



Qué nos falta?

- Ensayo del “DESAFÍO” en modelo animal validado: Hamster dorado Sirio
- Necesitamos construir un contenedor de seguridad 3
- Inmunizar a los animals
- Desafiar a los animales con el virus SARS-CoV-2 (colaboración con el INS)
- Monitorear la variación de la carga viral a nivel del sistema respiratorio (q-RT-PCR, hisopado intranasal)
- Monitorear el daño a nivel del tejido pulmonar de los animals (necropsia)
- Monitorear variaciones en el peso y en la temperatura corporal

Contenedor de nivel de seguridad BSL3 para el desafío de los hamsters



El reto: Ensayos clínicos Fase I, II y III

• Fase I: (N=40) Fase II: (N=500) Fase III: (N=2,000-10,000)

- Limitaciones:

- Producción de las dosis -> Laboratorio con certificación GMP

- -Tercerización en una empresa GMP extranjera (6,000 dosis)
 - -Certificación de una facilidad GMP local para la producción de las dosis
 - -Consolidar una planta GMP para producir la vacuna

- Costos de producción en el extranjero

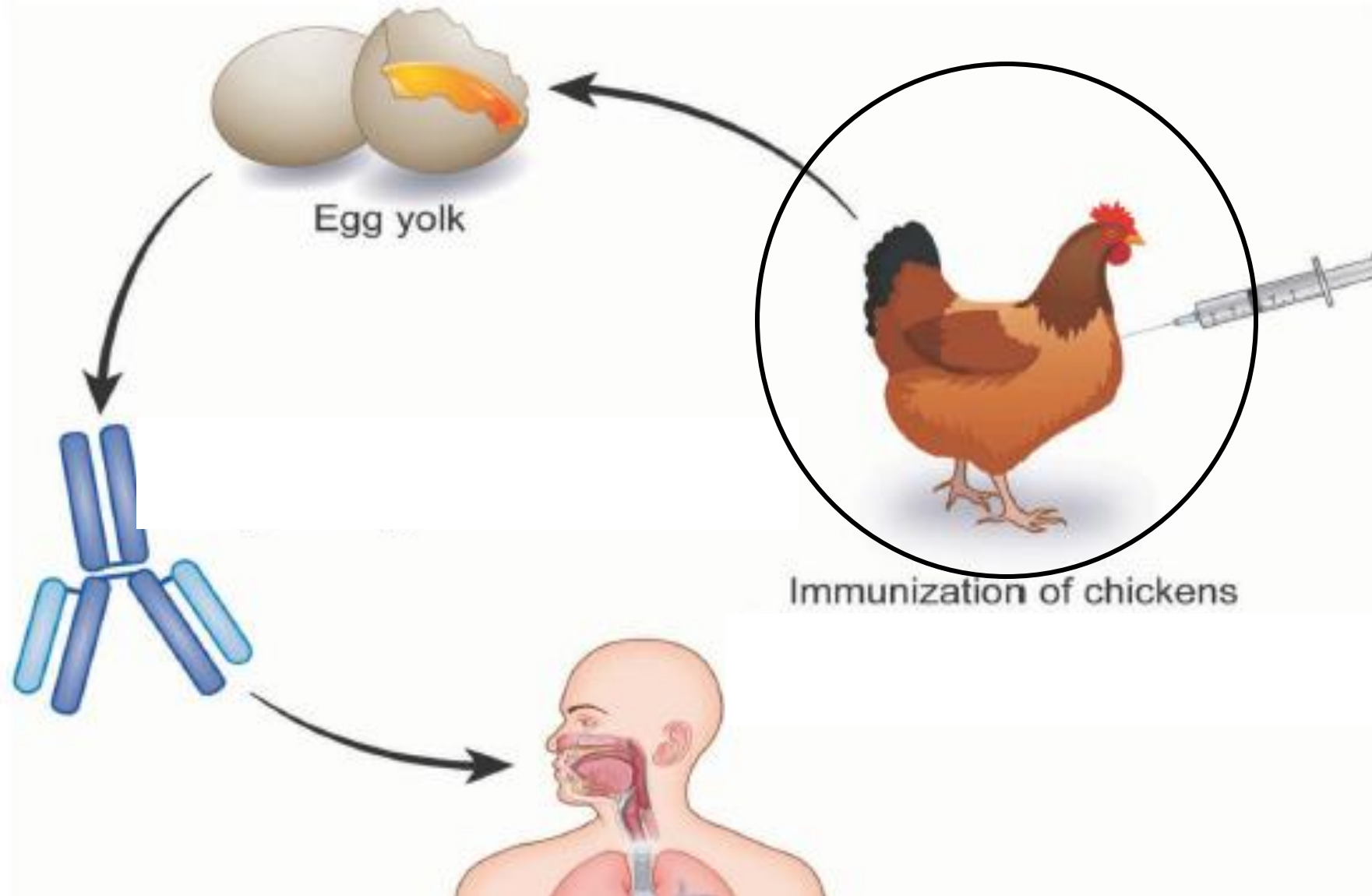
- 6,000 dosis de la vacuna de salmonella: USD \$150,000
 - 6,000 dosis de la vacuna de proteína recombinante: aprox. USD \$1'000,000

- Costos de los ensayos clínicos

- Fase I: USD \$4,000 /participante →(N=40: \$160,000)
 - Fase II: USD \$3,000/participante →(N=500: \$1'500,000)
 - Fase III: USD \$2,000/participante →(N=2,000: \$4'000,000 / N=10,000: \$20'000,000)

Anticuerpos IgY de gallina purificados del huevo como tratamiento para casos severos de COVID-19

Anticuerpos IgY para la Inmunoprofilaxis y terapia de infecciones respiratorias



Flujo de Trabajo

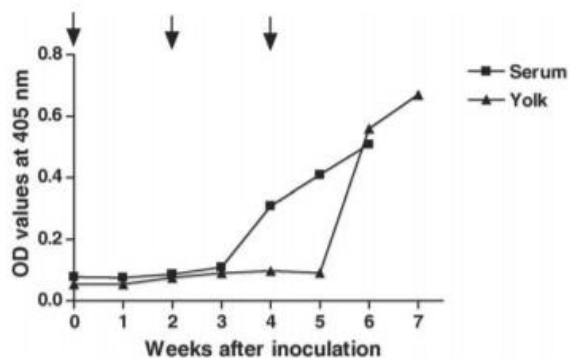
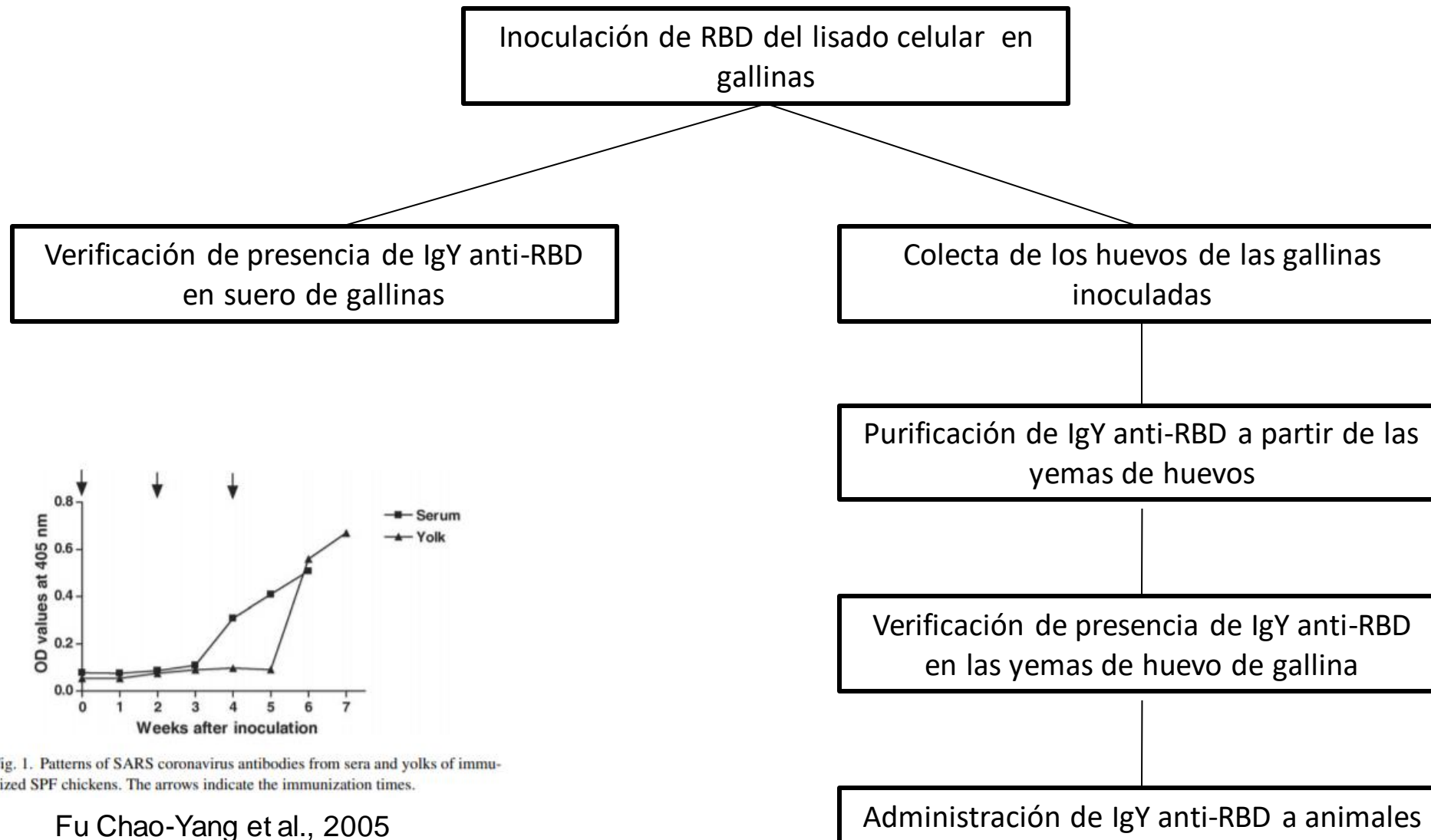


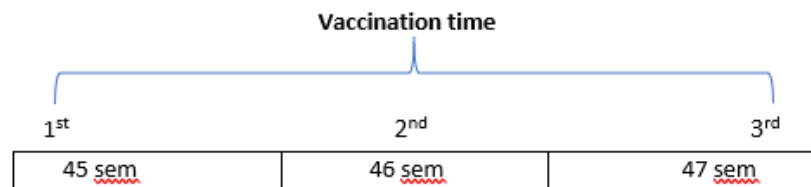
Fig. 1. Patterns of SARS coronavirus antibodies from sera and yolks of immunized SPF chickens. The arrows indicate the immunization times.

Fu Chao-Yang et al., 2005

1. Inoculación de RBD del lisado celular en gallinas



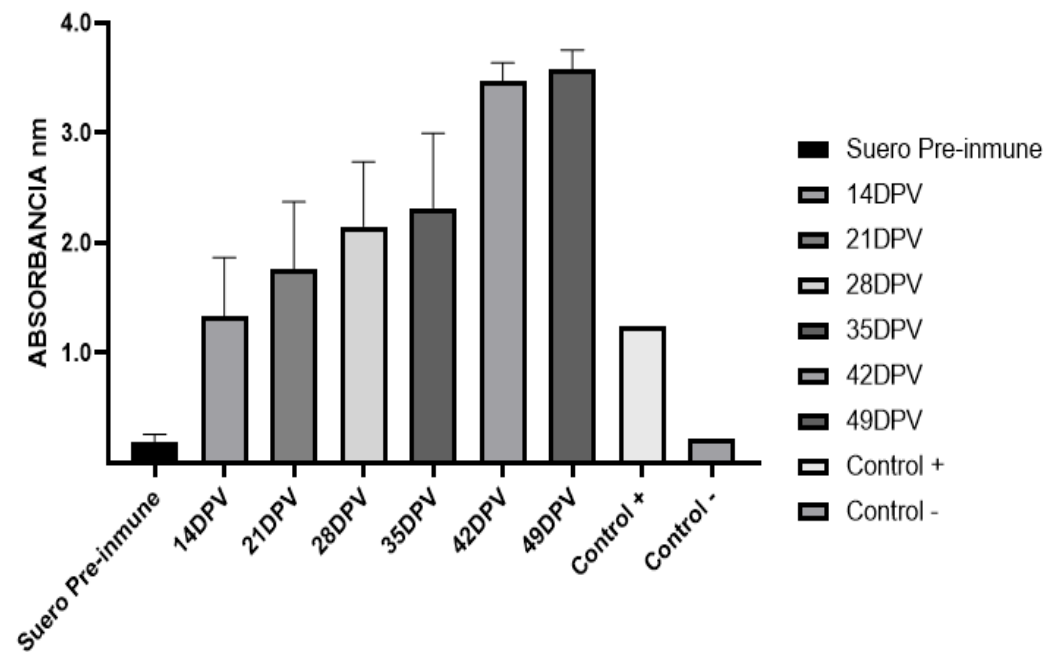
- **Vía de inoculación:** Intramuscular y subcutánea
- **Adyuvante:** ISA 71R VG
- **Dosis:** 50% de aceite con 50% antígeno en un volumen final de 2 mL
- **Suspensión-prensa:** 04 veces 40psi/1 vez 80psi
- **Modelo animal:** Gallinas



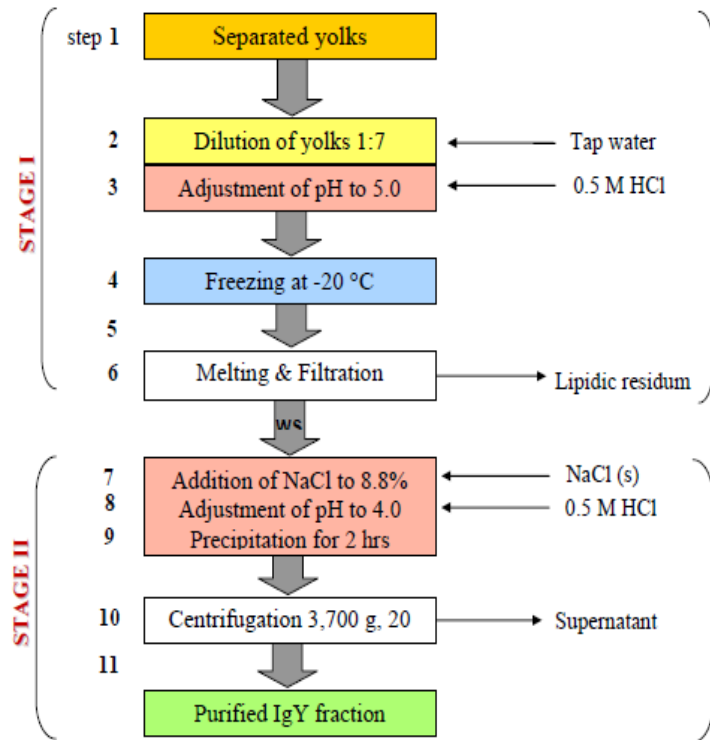
Collect sera at 0 and 10 days post-each vaccination

Vaccination	Date	Dose
1st.	09/05/2020	2mL
2nd.	16/05/2020	2mL
3rd.	23/05/2020	2mL

ELISA DE GALLINAS INMUNIZADAS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD

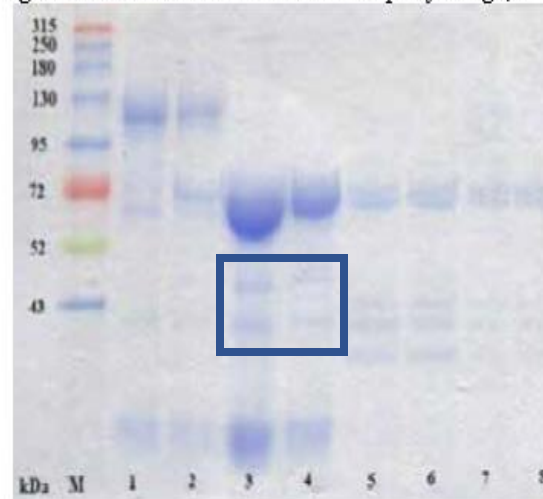


2. Obtención y purificación de la proteína IgY mediante “salting-out”

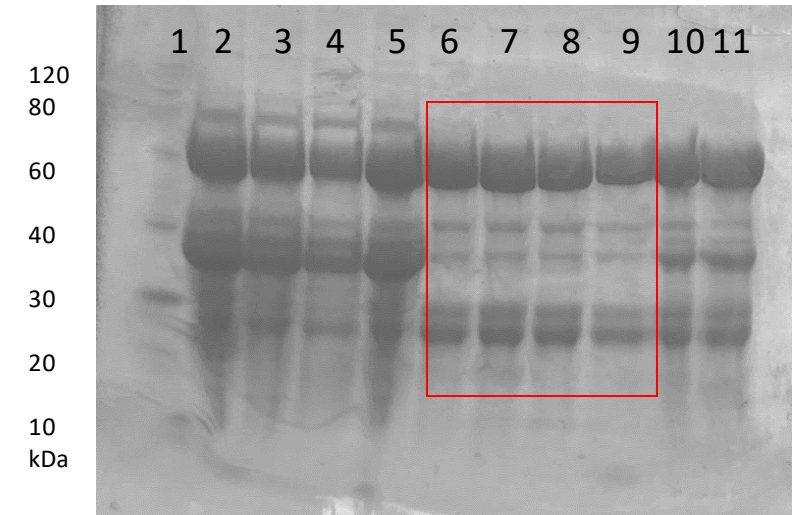


Hodek et al., 2013

Figure 1. The SDS-PAGE profile of IgY (M: marker, 1 and 2: standard IgY non-reduced, 3 and 4: standard IgY reduced, 5 and 6: WSF, 7 and 8: purified IgY).



Wibawan et al., 2018



Line 1: Ladder; lines 2, 3, 4, 5: WSF of immunized yolks (RBD antigen) using HCL, HCL + slow freezing method, lemon and vinegar, respectively; lines 6, 7, 8, 9: purified IgY using HCL, HCL + slow freezing method, lemon and vinegar, respectively; Lines 10, 11: Purified IgY using the gallus immunotech inc. IgY EggsPress Purification Kit, respectively.

3. Obtención y purificación de la proteína IgY mediante “PEG”

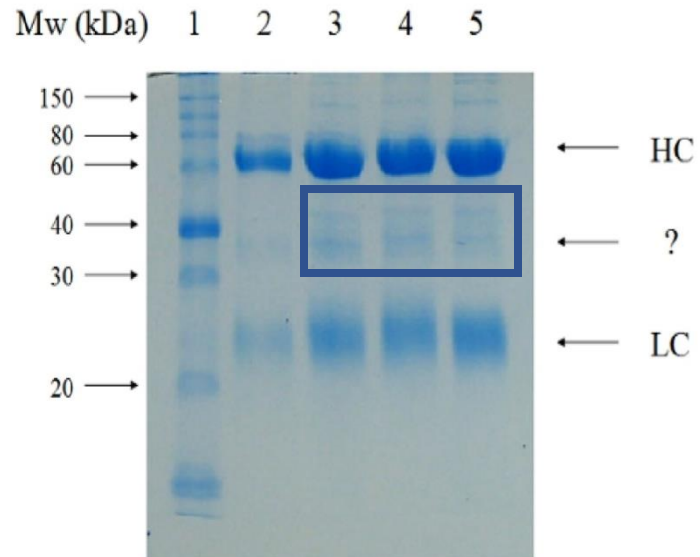
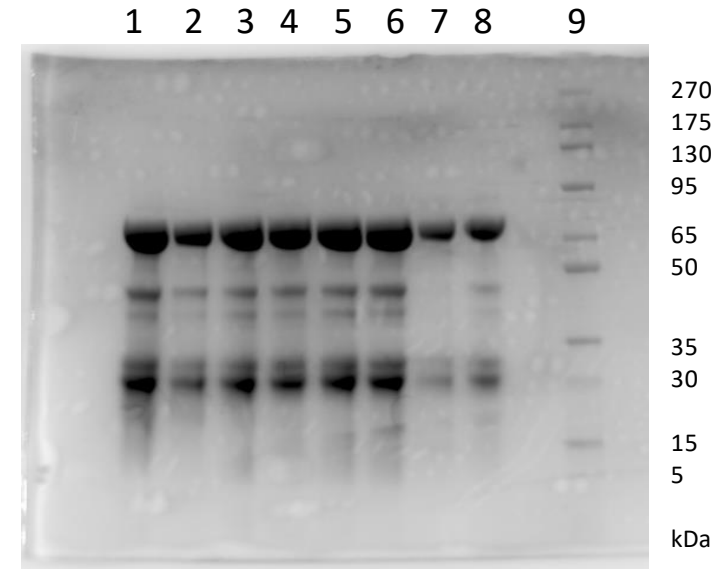


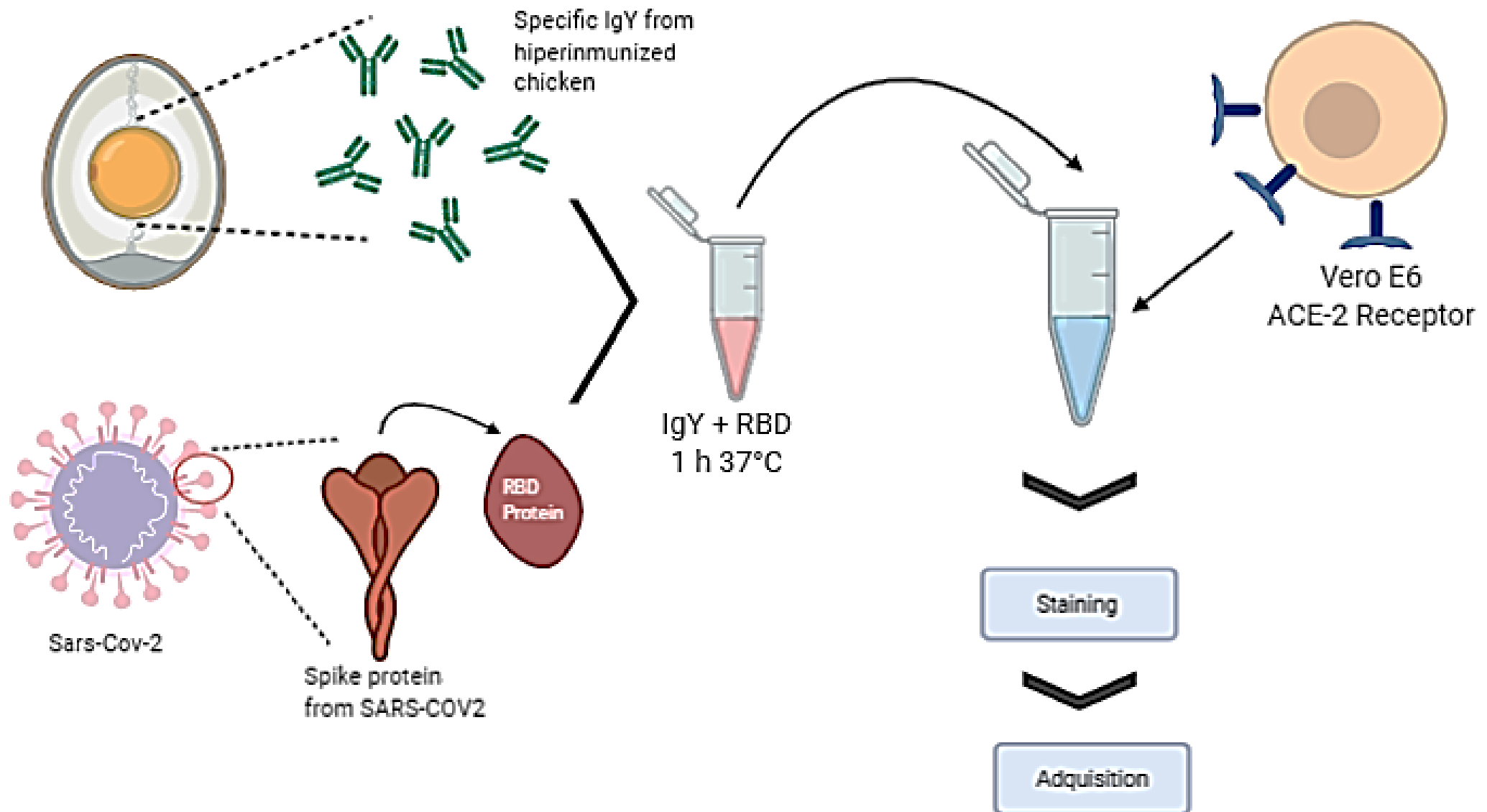
Figure 4. Polyacrylamide-Gelelectrophoresis of individual IgY preparations from different eggs under reducing conditions
Lane 1 - Molecular weight marker, Lane 2 - IgY-standard, Lane 3-5 - different IgY samples prepared as described in the protocol. These are final preparations according to step 10 of the protocol. HC - heavy chains, LC - light chains, ? - minor impurities corresponding to molecular weight around 35 kDa (probably the C-terminal fragment of vitellogenin II precursor, [Klimentzou *et al.*, 2006]).

Pauly *et al.*, 2011

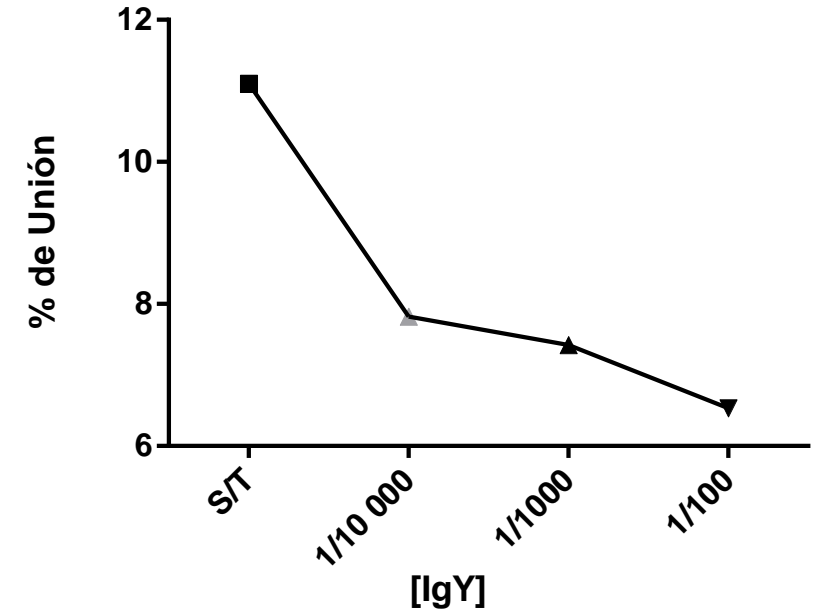
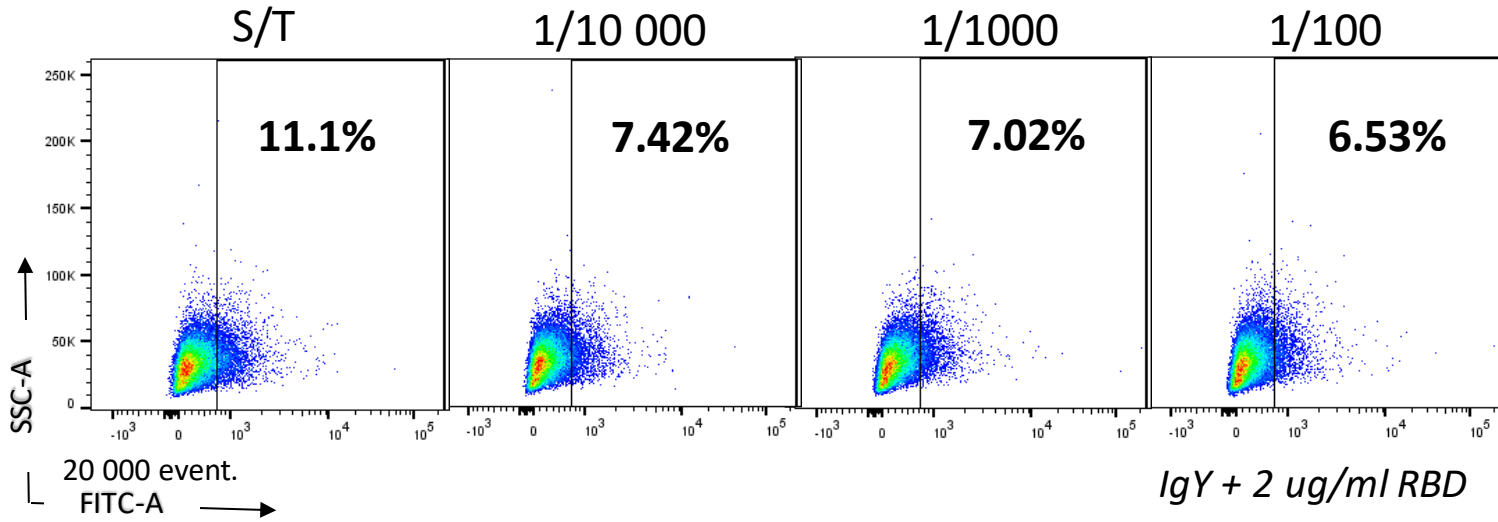


Line 1-6: IgY purified by PEG method (10 ug), Line 7-8: IgY purified by PEG method (5 ug), Line 9: Ladder

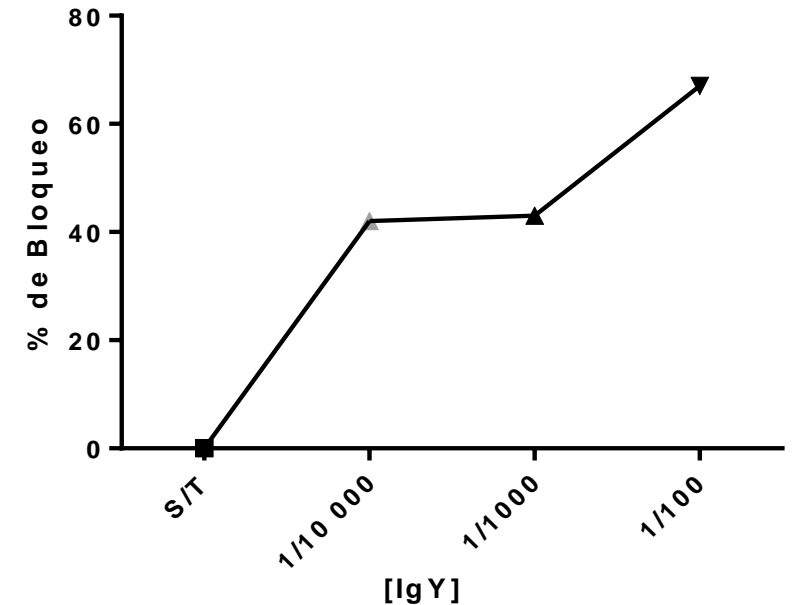
Ensayo de bloqueo con yemas de huevos de gallinas Hiper-inmunizadas



Ensayo de bloqueo con las diluciones de IgY en suero de Ratón



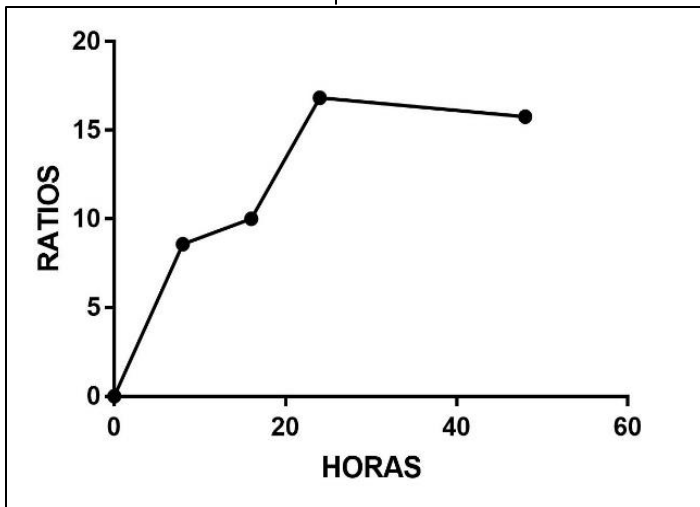
IgY (56.6 mg/ml)	S/T	1/10 000 (5.66 ug/ml)	1/1000 (56.6 ug/ml)	1/100 (566 ug/ml)
% Unión	11.1	7.42	7.02	6.53
% Bloqueo	0	42	43	67



4. Administración de IgY-anti RBD en animales

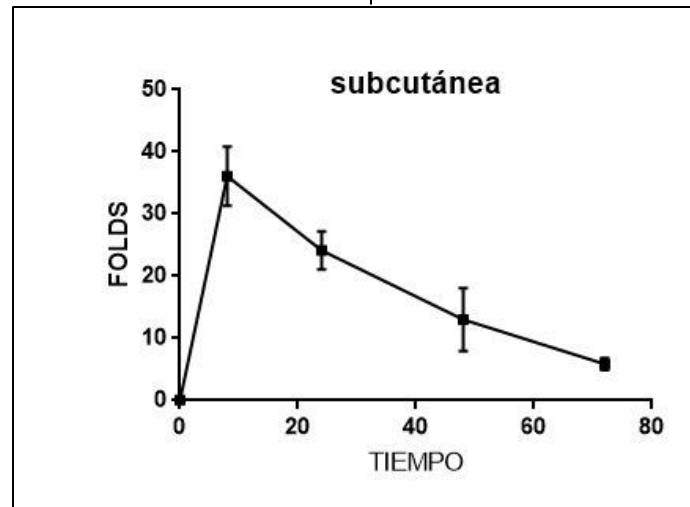
Administración subcutánea

CONEJOS



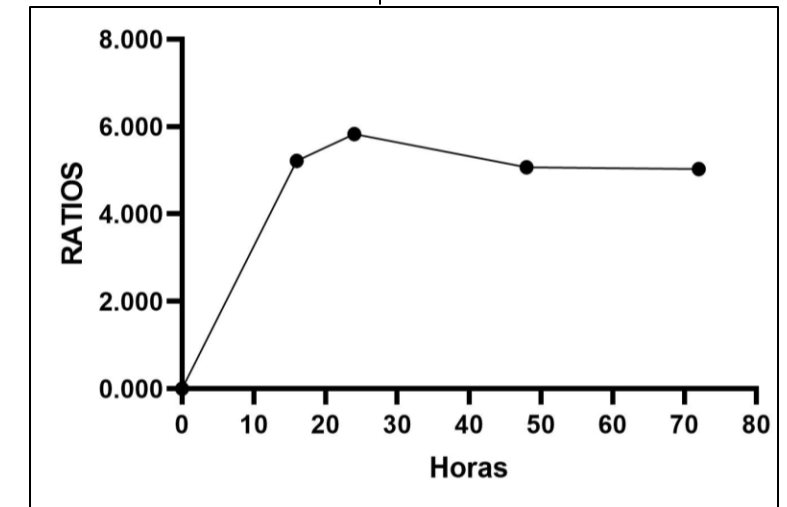
Yemas de huevos: 21 DPV aprox.
Peso de conejos: 3 kilos
[] IgY anti-RBD: 25 mg/kg (1x)
Volumen: 1.5 mL

RATONES



Yemas de huevos: 35 DPV aprox.
Peso de ratones: 25 – 30 gramos
[] IgY anti-RBD: 125 mg/kg (1x)
Volumen: 125 µL

CERDOS

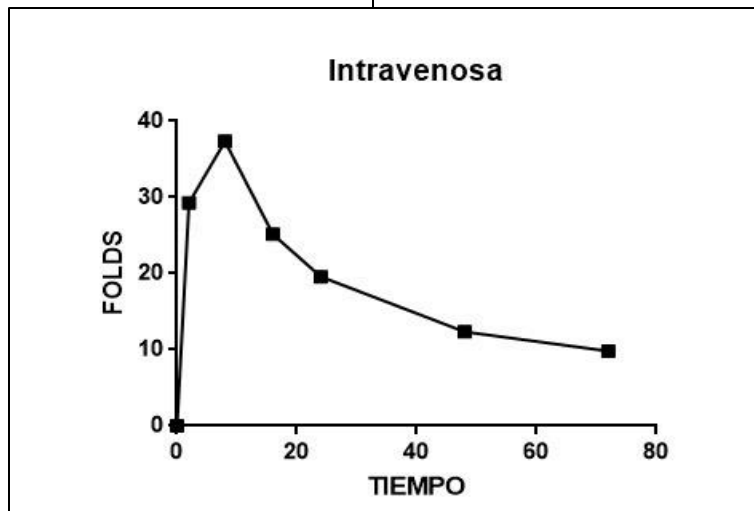


Yemas de huevos: 50 DPV aprox.
Peso de cerdos: 20 kilos aprox.
[] IgY anti-RBD: 75 mg/kg (3x)
Volumen: 10 mL

5. Administración de IgY-anti RBD en animales

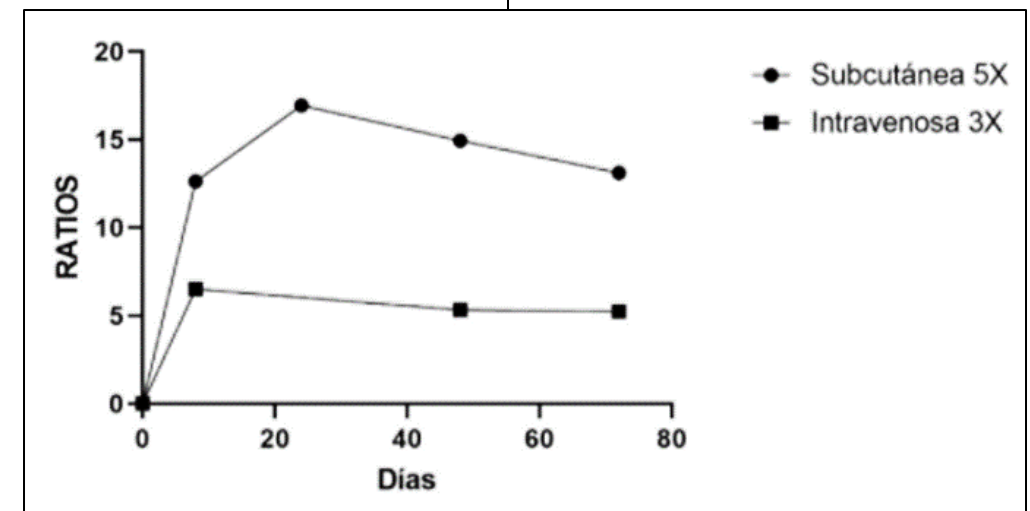
Administración intravenosa

RATONES



Yemas de huevos: 35 DPV aprox.
Peso de ratones: 25 – 30 gramos
[] IgY anti-RBD: 125 mg/kg (1x)
Volumen: 125 μ l

CERDOS

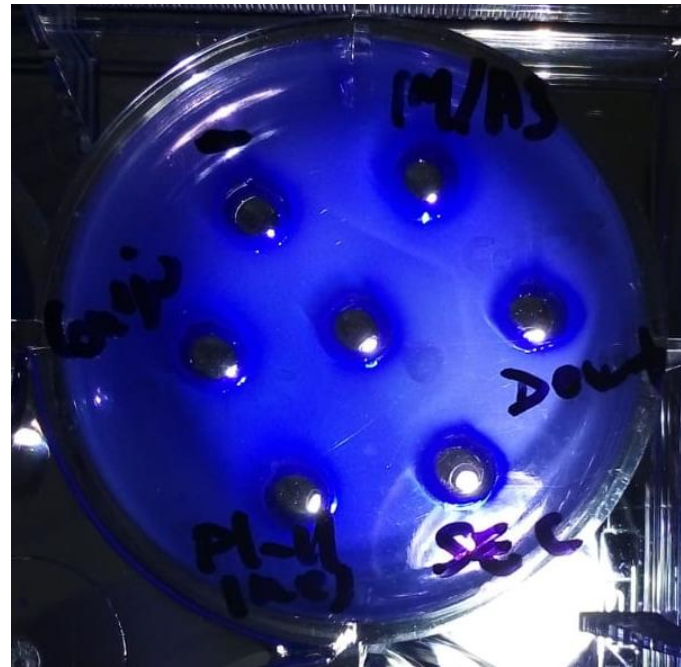


Yemas de huevos: 60 DPV aprox.
Peso de cerdos: 20 kilos aprox.
[] IgY anti-RBD: 75 mg/kg (3x) – 125 mg/kg (5x)
Volumen: 30 – 50 mL

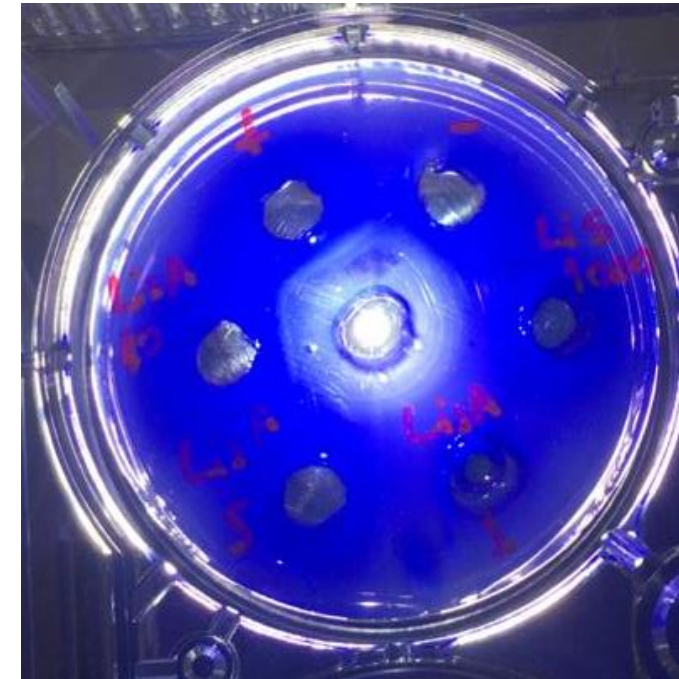
6. Inmunodifusión doble de Ouchterlony



Establecimiento de controles positivos y negativos

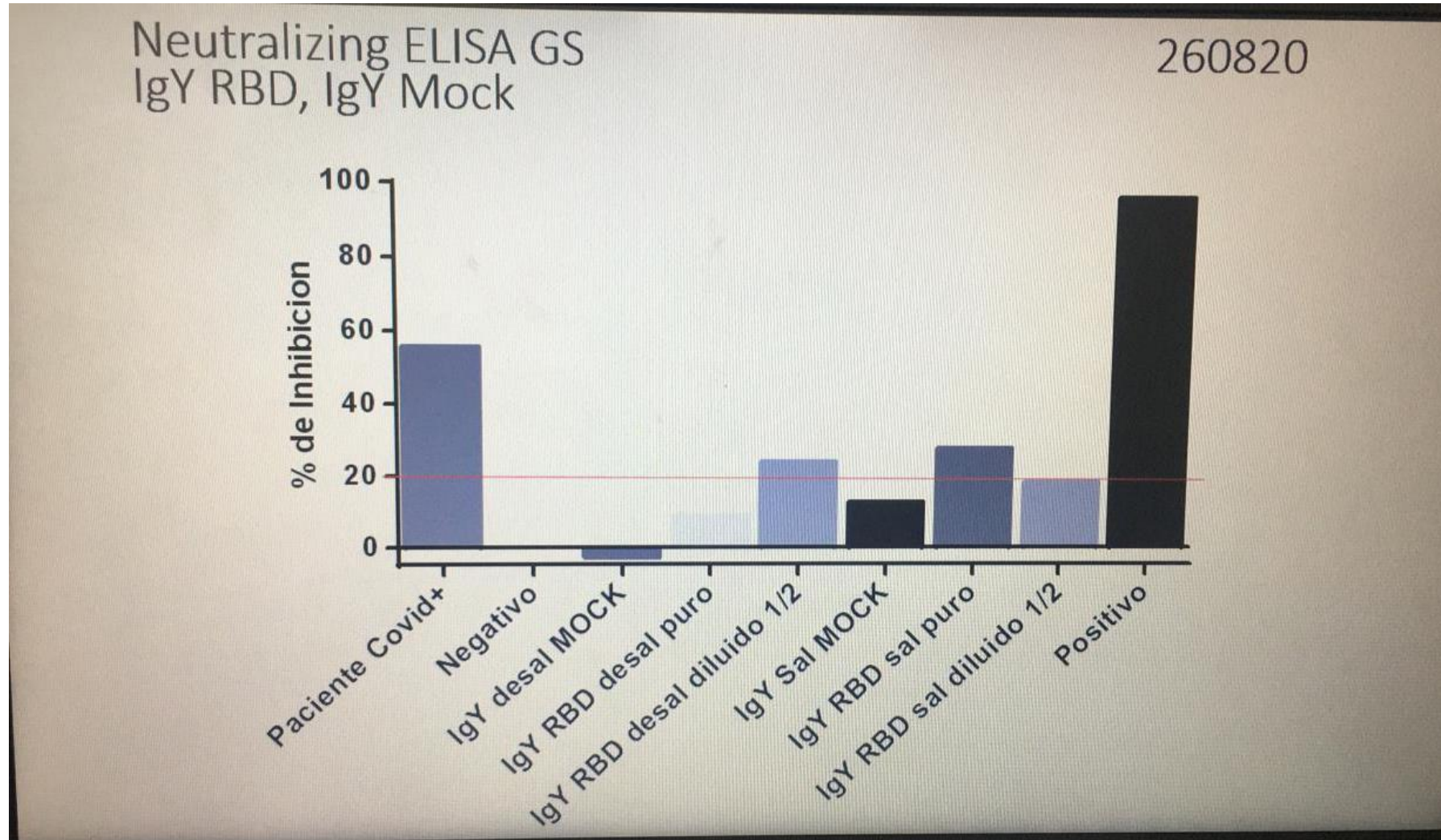


Positivo para IgY desalado y purificado por SEC en Sephadex G-75 (10 semanas PV)



Positivo para IgY sin desalar 10 mg/mL (10 semanas PV)

7. Neutralización – huevos de 10 semanas



7. Neutralización



Yema de huevo de 74DPV aproximadamente



Neutralización de suero de cerdo con SARS-CoV 2. Se administró 75 mg/kg de IgY anti-RBD de yemas de huevo de 50DPV aprox., en total 1.5 g de IgY anti-RBD en un volumen de 15 mL en la zona subcutánea de un cerdo de 20-25 Kg.



Neutralización de suero de ratón con SARS-CoV 2. Se administró 125 mg/kg de IgY anti-RBD de yemas de huevo 35DPV aprox., en total 3.75 mg de IgY anti-RBD en un volumen de 125 μ L en la zona subcutánea del ratón.