

# HACIA LA VACUNA ESPAÑOLA CONTRA EL SARS-COV-2, CAUSANTE DE LA PANDEMIA COVID-19

## TOWARDS THE SPANISH VACCINE AGAINST SARS-COV-2, RESPONSIBLE FOR THE PANDEMIC COVID-19

Mariano Esteban<sup>1</sup>; Juan García Arriaza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Profesor de Investigación Ad Honorem del CSIC

<sup>1</sup>Jefe del Grupo de Poxvirus y Vacunas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

<sup>1</sup>Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF)

<sup>2</sup>Investigador contratado en el Grupo de Poxvirus y Vacunas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

### Palabras clave:

Coronavirus  
SARS-CoV-2;  
Pandemia;  
COVID-19;  
Vacunas;  
Respuestas inmunes;  
Anticuerpos;  
Neutralización;  
Células T;  
Ensayos clínicos.

### Keywords:

Coronavirus  
SARS-CoV-2;  
Pandemic;  
COVID-19;  
Vaccines;  
Immune responses;  
Antibodies;  
Neutralizing;  
T cell responses;  
Clinical trials.

### Resumen

Hay un consenso general de que la única manera de parar la pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2 es a través del desarrollo de una vacuna eficaz y segura. Varios países se han puesto manos a la obra para obtener una vacuna, y ya se han realizado ensayos preclínicos y clínicos fases I/II que demuestran que algunas de las vacunas inducen activación de respuestas inmunes humorales y celulares que se pueden correlacionar con protección, pero aún no se ha demostrado que los candidatos vacunales protejan frente al coronavirus. Nuestro grupo de Poxvirus y Vacunas del CNB-CSIC inició el desarrollo de una vacuna en enero de 2020 tan pronto como se publica la secuencia completa (30.000 nucleótidos) del genoma del SARS-CoV-2. En este artículo se describen los pasos que hemos seguido para desarrollar una vacuna frente al SARS-CoV-2 utilizando como vehículo transportador una variante de la vacuna que se usó para erradicar la viruela, la enfermedad más mortífera que ha padecido la humanidad. Hemos desarrollado un candidato vacunal que expresa en el genoma del virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) la proteína completa S (Spike) y demostrado en células en cultivo y en animales, una serie de propiedades que son importantes en protección, como formación de oligómeros, localización en membrana, alta estabilidad, capacidad para inducir una amplia gama de respuestas inmunes, humorales con producción de anticuerpos neutralizantes frente al coronavirus, tipo de respuesta Th1, así como activación de linfocitos T CD4+, CD8+, Tfh, Tregs, y de memoria específicos frente al SARS-CoV-2. Hemos programado ensayos de eficacia en ratones humanizados y en macacos, así como ensayos clínicos fases I/II y III. Una empresa española está produciendo el lote GMP de la vacuna que ya hemos patentado.

### Abstract

There is a general consensus that the only way to stop the pandemic caused by the coronavirus SARS-CoV-2 is through the development of an effective and safe vaccine. Various countries have move forward to develop a vaccine, and currently a number of preclinical and clinical trials phase I/II revealed that some of the vaccines triggered activation of humoral and cellular immune responses that could be relevant in protection against the coronavirus, but it remains yet to demonstrated efficacy in the population of any of the vaccines. Our group of Poxvirus and Vaccines at the CNB-CSIC started with the development of a vaccine immediately after the full genome (30.000 nucleotides) sequence of the SARS-CoV-2 was published in January 10, 2020. In this article we describe the steps that we have follow up to develop a vaccine candidate using as a vector (vehicle) an attenuated strain of modified vaccinia virus strain (MVA) expressing the full-length S (Spike) protein of SARS-CoV-2. We have demonstrated in cultured cells and in animals (mice) that the vaccine fulfills relevant criteria to be considered a candidate against COVID-19, like expression of the entire protein at the cell membrane, formation of oligomers (trimers), high stability and ability to induce neutralizing antibodies, a type of Th1 response and induction of a wide spectrum of SARS-CoV-2 specific T cells, like CD4+, CD8+, Tfh, Tregs and memory cells. We have programmed efficacy studies in animals (humanized mice and macaques) and phase I/II and III clinical trials. The GMP lot is under production by an Spanish company and a patent has been presented.

### Autor para la correspondencia

Mariano Esteban  
Departamento de Biología Molecular y Celular  
Centro Nacional de Biotecnología. CSIC, España  
C/ Darwin, 3 · 28049 Madrid  
Tlf.: +34 91 585 45 60 | E-Mail: mesteban@cnb.csic.es

## INICIO DE LA VACUNA MVA-COVID19(S)

Cuando el 10 de enero de 2020 se publicó por científicos chinos la secuencia completa del genoma de alrededor de 30.000 nucleótidos del SARS-CoV-2 (1,2), y después de haber seguido las noticias en China que indicaban la aparición de un nuevo virus, perteneciente a la familia de los coronavirus, como el causante de un síndrome agudo respiratorio severo (SARS), rápidamente consideramos que deberíamos de dirigir nuestra investigación al desarrollo de una vacuna contra este virus. Como el investigador del laboratorio Juan García Arriaza había desarrollado en los años previos varias vacunas muy prometedoras frente a otros virus emergentes, como chikungunya, ébola y zika, fue la persona ideal para desempeñar dicha labor. Mi grupo lleva más de 30 años trabajando en vacunas contra enfermedades emergentes, por lo que era lógico que el laboratorio de Poxvirus y Vacunas del CNB-CSIC que dirijo se pusiera manos a la obra. Lo primero fue considerar cuál de los antígenos del nuevo coronavirus podría ser el mejor para inducir respuestas inmunes protectoras. Debido a que el SARS-CoV-2 pertenece al género betacoronavirus, de los que 7 miembros infectan humanos y sólo tres (SARS-CoV-1, MERS y SARS-CoV-2) son altamente patogénicos, consideramos que la mejor opción era focalizar como antígeno de elección a la proteína S (Spike) que se proyecta desde la membrana externa del coronavirus y que previamente se la había considerado como antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes en otros miembros de la familia (3). La consideración fue si apostar por la proteína completa o bien modificada o utilizar alguna de sus partes, como los dominios S1, S2 o el de unión al receptor (RBD). Pronto se supo que el receptor del SARS-CoV-2 era el mismo que el del SARS-CoV-1, una proteína llamada enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2), y cuyo dominio de unión en el virus se encuentra localizado en el RBD, dentro de la región S1 (4). Decidimos apostar por la proteína S completa, la misma que se produce durante la infección por el SARS-CoV-2.

## DISEÑO DE LA VACUNA

Así pues, lo primero fue diseñar en enero de 2020 el tipo de vacuna. En el laboratorio trabajamos con la familia de poxvirus, que son virus con material genético de ADN (unos 200.000 nucleótidos) ampliamente distribuidos en la naturaleza, y uno de sus miembros ha sido el causante de la enfermedad más letal que ha padecido el ser humano, la viruela. Gracias a la existencia de una vacuna y con un programa de vacunación masivo coordinado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se consiguió erradicar la viruela, y en 1980 la OMS declaró la eliminación completa de esta enfermedad en nuestro planeta. Ello fue posible por la existencia de una vacuna muy potente basada en un virus vaccinia replicativo pero atenuado, que con una sola dosis de administración por escarificación consiguió producir una inmunidad duradera contra la viruela. Esta vacuna ha sido mejorada y hoy en día hay otras vacunas de

tercera generación entre las cuales se encuentra la vacuna atenuada basada en el virus vaccinia modificado de Ankara, más conocido como MVA. De hecho el MVA fue utilizado en la campaña de erradicación de la viruela en Alemania en unas 120.000 personas, sin efectos adversos. Las agencias reguladoras, FDA (Food and Drug Administration) de EE.UU y la EMA (European Medicinal Agency) han aprobado recientemente el uso de MVA como vacuna contra la viruela (5), en el caso de que esta enfermedad apareciera por acto bioterrorista. Candidatos vacunales basados en MVA se están utilizando en numerosos ensayos clínicos de fases I/II frente a distintos patógenos y otras enfermedades (6, 7). La ventaja fundamental es su alta atenuación, con una replicación limitada en células humanas sin producir progenie viral, una gran seguridad, con la capacidad para incorporar genes de otros agentes, alta estabilidad y altos niveles de expresión de las proteínas recombinantes incorporadas en su genoma. Nuestro grupo lleva muchos años utilizando vectores de poxvirus, particularmente las estirpes MVA y NYVAC (New York vaccinia virus) como candidatos vacunales frente a múltiples patógenos. De hecho hemos demostrado con vectores de MVA que expresan antígenos de los virus emergentes Ébola, chikungunya y zika, que los candidatos vacunales confieren una alta protección (entre el 80 y el 100%) en animales inmunizados con dichos vectores (8-13). También confieren una alta eficacia en modelos animales frente a malaria y leishmania (14, 15). Esta eficacia se debe a que durante la inmunización con estas vacunas se produce la activación de los dos brazos del sistema inmune, el que produce anticuerpos neutralizantes y el que genera activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ que actúan destruyendo a la célula infectada.

Basándonos en la generación de otros recombinantes de MVA que habíamos desarrollado en el laboratorio, decidimos seguir una estrategia semejante, para lo cual diseñamos un vector plasmídico pCyA que incorporara el gen completo de la proteína S del SARS-CoV-2, utilizando la secuencia publicada del genoma del SARS-CoV-2. Se realizó el diseño y se envió a la empresa GeneArt (Thermo Fisher Scientific) para que sintetizara el gen S dentro de nuestro vector. Recibimos a mediados de febrero de 2020 el vector plasmídico y Juan rápidamente se puso manos a la obra para amplificarlo, demostrar que la secuencia era correcta, y que expresaba el gen S con un tamaño de proteína de 180 kDa. Esto se hizo en experimentos de infección-transfección, que realizamos para generar la vacuna MVA-COVID19.

## GENERACIÓN DE LA VACUNA

En los experimentos de infección-transfección, se infectan células permisivas para MVA, como las células DF-1 de pollo, a baja multiplicidad y luego se transfectan con el plásmido conteniendo el gen S (pCyA-S). Al cabo de 48-72 horas se inicia el proceso de selección de clones recombinantes. La estrategia consistió en utilizar un MVA conteniendo el gen fluorescente GFP, por lo que únicamente las placas

de virus que son seleccionadas son aquellas que son negativas para GFP pero positivas para el marcador  $\beta$ -galactosidasa que lleva el plásmido pCyA-S. Este proceso se repite durante múltiples etapas, al menos 4 a 6, hasta seleccionar la placa de virus recombinante definitiva que no expresa ninguno de los marcadores por un proceso de recombinación homóloga, como venimos realizando en el laboratorio. Así, y tras mucho esfuerzo, Juan pudo conseguir entre finales de marzo y principios de abril la placa de virus correcta. Coincidió que en una visita a mi laboratorio del CNB-CSIC, el Ministro de Ciencia e Innovación, Pedro Duque, quedara impresionado cuando Juan le enseñó una placa de seis pocillos indicándole que ya habíamos obtenido el candidato vacunal MVA-COVID19(S), lo que fue muy bien recogido y anunciado por el Ministro en rueda de prensa, “tuve la vacuna en mis manos”. También Juan aisló otro candidato vacunal MVA expresando la proteína S pero conteniendo 3 deleciones en el genoma viral para incrementar la inmunogenicidad del vector vacunal [al que llamamos MVA- $\Delta$ -COVID19(S)].

## ENSAYOS PRECLÍNICOS

Había ahora que demostrar que la vacuna cumplía con una serie de requisitos, lo que se llevó a cabo en cultivos celulares. Así pues, lo primero fue producir en grandes cantidades los stocks virales en células DF-1, para lo que se infectaron placas grandes de 150 mm (5 en el caso del P-2; stock de un extracto de células infectadas en fase 2) y 30 placas en el caso del P-3 (stock parcialmente purificado de fase 3). A continuación se demostró en células en cultivo, tanto permisivas (de pollo) como no permisivas (humanas), que la vacuna produce la proteína S completa, sin mutaciones, forma oligómeros (trímeros), está glicosilada, se localiza en la membrana de la célula infectada, y la secuencia del gen S se mantiene integrada de forma estable en el ADN del MVA durante múltiples pases sucesivos a baja multiplicidad de infección. Estos experimentos se llevaron a cabo entre los meses de abril y mayo.

El siguiente paso, entre los meses de mayo y junio, fue demostrar la inmunogenicidad de la vacuna en un modelo experimental animal. Elegimos el ratón C57BL/6 y llevamos a cabo un experimento con grupos de ratones en el que comparamos el efecto de la vacuna basada en el MVA expresando S, con y sin deleciones, administrada en dos dosis separadas por dos semanas; otro grupo inmunizado con ADN expresando S, seguido al cabo de dos semanas de una segunda dosis con MVA-S, con y sin deleciones; y otro grupo control, infectado con el MVA parental sin inserto. Al cabo de 10 días después de la última dosis, se sacrificaron los ratones y se obtuvo sangre y el bazo para analizar la producción de anticuerpos en suero y la respuesta de células T en esplenocitos, respectivamente. Los resultados obtenidos con el suero de los distintos ratones son muy prometedores y demostraron que la vacuna MVA-COVID19(S) produce anticuerpos neutralizantes frente al virus

SARS-CoV-2 y contra seudopartículas basadas en lentivirus que contienen la proteína S, con altos niveles de neutralización. También observamos que en el bazo de los animales se producen células T con capacidad para reconocer a una célula infectada por el coronavirus SARS-CoV-2 y destruirla. Observamos la activación de células T CD4+, CD8+, células T CD4+ foliculares cooperadoras y CD4+ T reguladoras, así como células de memoria, específicas frente al antígeno S. Todos estos resultados son muy prometedores y demuestran que la vacuna produce respuestas inmunes que se consideran muy importantes en protección (manuscrito enviado a publicación).

La eficacia de la vacuna la demostraremos en un modelo de ratón humanizado que recibiremos a finales del mes de julio. Este ratón expresa el receptor ACE2 humano lo que le hace susceptible frente a la infección por el SARS-CoV-2. Inmunizaremos los ratones durante los meses de agosto-septiembre y en septiembre-octubre los infectaremos con el SARS-CoV-2 en el centro de investigación en sanidad animal (CISA), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), un centro de alta seguridad con categoría NCB-3. De forma adicional tenemos programado experimentos en hámster y un ensayo en macacos para confirmar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna. En junio se presentó la patente de la vacuna.

## ENSAYOS CLÍNICOS

Para llevar a cabo los ensayos clínicos en humanos lo primero que hay que hacer es la producción de la vacuna en condiciones de buenas prácticas (GMP). Con esa finalidad establecimos una colaboración con la empresa gallega CZ Vaccines, a la que transferimos la vacuna en el mes de junio. Actualmente la empresa está desarrollando el plan de producción para obtener dosis suficientes, inicialmente para la realización de los ensayos clínicos de fases I/II. Si todo va bien, se podría iniciar la fase I a finales del año 2020 y continuar en 2021 la fase II en el primer trimestre del año, y la fase III a partir del verano de 2021. La fase III de eficacia requiere de un número considerable de personas sanas pero expuestas al virus, principalmente personal sanitario y en lugares de riesgo, como zonas con rebrotes y residencias de mayores.

## DONDE ESTAMOS EN COMPARACIÓN CON OTROS CANDIDATOS VACUNALES

Aunque el proyecto lo iniciamos con recursos previos propios, el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través del Instituto de Salud Carlos III lanzó en el mes de marzo una iniciativa con 24 millones de euros para estudiar cómo parar y controlar la pandemia COVID-19. Esta financiación ha ayudado a que se hayan financiado más de 130 proyectos de investigación en España, aunque esta cantidad se

queda reducida si la comparamos con la financiación asignada por otros países. Sólo en vacunas, países como EE.UU, China, Reino Unido, Alemania y Francia han asignado cientos de millones en la consecución de una vacuna, con empresas añadiendo miles de millones. En esta “carrera” por la vacuna, los más avanzados en el mes de julio son dos vacunas, una producida en Oxford basada en un adenovirus de chimpancé que expresa la proteína S, y otra producida por la empresa americana Moderna que expresa S mediante un ARNm sintético. Ambos han demostrado en un número reducido de personas y en fases clínicas I/II que la vacuna es segura y que produce respuestas inmunes, con producción de anticuerpos neutralizantes y activación de linfocitos T. Ambas vacunas ya han iniciado la fase III para demostrar eficacia. Según la OMS hay más de 163 candidatos vacunales actualmente en desarrollo, los cuales utilizan diferentes estrategias, como vacunas basadas en virus completo atenuado o inactivado, en otros vectores virales no relacionados, como MVA o adenovirus, en forma de subunidades (proteína viral o pseudopartículas sin material genético) o basadas en ácidos nucleicos (ARNm y ADN) que han iniciado o están a punto de iniciar las fases clínicas. Cuál de estas vacunas llegará a su fase final se verá en el tiempo de pandemia. De momento no se ha demostrado con ninguna de las vacunas su eficacia clínica contra el SARS-CoV-2.

Es indudable que empresas con gran poder económico conseguirán producir la vacuna para cientos de millones de personas, aunque algunas ya señalan capacidad para producir miles de millones de dosis, a través de consorcios con empresas en distintos países. En Europa se ha creado una asociación de países, entre ellos España, para obtener suficientes dosis de la vacuna que demuestre eficacia, sobre todo para personal expuesto como son los sanitarios y personas mayores. De todos modos, en España no podemos permanecer al margen en el desarrollo de vacunas, pues no sabemos si las vacunas que van más avanzadas serán las más eficaces o si tendremos que esperar la llegada de otras vacunas más potentes. De hecho ya hay una serie de grupos en España involucrados en el desarrollo de vacunas que utilizan distintas aproximaciones. Una limitación importante es que no disponemos de macacos en los dos centros de experimentación animal con nivel de seguridad NCB-3 en España, CISA en Madrid y CReSA en Cataluña, lo que dificulta la rapidez con la que se pueden realizar los experimentos requeridos por las agencias reguladoras para obtener las aprobaciones necesarias para la realización de los ensayos clínicos. La opción de ponerse en lista de espera en otros centros internacionales con macacos, no solo supone un retraso considerable, si no que dificulta la progresión de las vacunas en nuestro país.

Recientemente el gobierno español ha lanzado un plan de choque para avanzar en la Investigación y Ciencia, incluyendo 1.056 millones de financiación en varias categorías, como infraestructuras y mejores facilidades de contratación y estabilidad del personal investigador, lo que se agradece en tiempos de carencias.

## CONSIDERACIONES FINALES

Hay que tener en cuenta que la pandemia COVID-19 sigue extendiéndose en todos los continentes con prácticamente todos los países afectados, con una incidencia de infectados a 18 de julio de más de 14 millones y más de 600.000 fallecidos, con la continua aparición de rebrotes, lo que exige medidas de confinamiento y pérdidas económicas enormes.

Indudablemente la vacuna es el remedio más eficaz de control, por lo que los países más avanzados tienen el deber y la obligación de contribuir al desarrollo de medidas de contención de la pandemia. Parece probable que no habrá una sola vacuna, si no varias que se puedan administrar en distintos países, al margen de su riqueza. Por ello, varias organizaciones mundiales, entre ellas GAVI y la Fundación Bill y Melinda Gates, están recaudando fondos para comprar las vacunas necesarias para administrarlas en las zonas más necesitadas y marginadas de nuestro planeta. A la velocidad que se está avanzando en el desarrollo de vacunas (más de 163 candidatos) y su valoración en ensayos preclínicos y clínicos, nos da la confianza como para decir que sí que tendremos una o varias vacunas eficaces contra el SARS-CoV-2. El poder de la “perseverancia”, característica de los científicos y lema de nuestro laboratorio, servirá para seguir en la senda de la consecución “sí o sí” de la ansiada y deseada vacuna. Con esa finalidad pondremos todos los medios y energía, con el deseo de que se produzca una gran apuesta duradera por la ciencia y la sanidad en España.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):727-733.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020; 579(7798):265-269.
3. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(8):523-534.
4. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483):1260-1263.
5. Pittman PR, Hahn M, Lee HS, et al. Phase 3 efficacy trial of modified vaccinia Ankara as a vaccine against smallpox. *N Engl J Med.* 2019; 381(20):1897-1908.
6. Volz A, Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara: History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv Virus Res.* 2017; 97:187-243.
7. Gómez CE, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M. Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. *Expert Rev Vaccines.* 2013; 12(12):1395-1416.

8. García-Arriaza J, Cepeda V, Hallengård D, et al. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection. *J Virol.* 2014; 88(6):3527-3547.
9. Hallengård D, Lum FM, Kümmerer BM, et al. Prime-boost immunization strategies against Chikungunya virus. *J Virol.* 2014; 88(22):13333-13343.
10. Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, et al. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight.* 2017; 2(6):e83527.
11. Pérez P, Q Marín M, Lázaro-Frías A, et al. A vaccine based on a modified vaccinia virus Ankara vector expressing Zika virus structural proteins controls Zika virus replication in mice. *Sci Rep.* 2018; 8(1):17385.
12. Lázaro-Frías A, Gómez-Medina S, Sánchez-Sampedro L, et al. Distinct immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vaccine candidates against Ebola virus expressing GP and VP40 proteins. *J Virol.* 2018; 92(11):e00363-18.
13. Öhlund P, García-Arriaza J, Zusinaite E, et al. DNA-launched RNA replicon vaccines induce potent anti-Ebolavirus immune responses that can be further improved by a recombinant MVA boost. *Sci Rep.* 2018; 8(1):12459.
14. Pérez-Jiménez E, Kochan G, Gherardi MM, Esteban M. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2006; 8(3):810-822.
15. Vijayan A, Mejías-Pérez E, Espinosa DA, et al. A prime/boost PfCS14KM/MVA-sPfCSM vaccination protocol generates robust CD8+ T cell and antibody responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein and protects mice against malaria. *Clin Vaccine Immunol.* 2017; 24(5):e00494-16.

## FINANCIACIÓN

El trabajo de desarrollo de la vacuna contra SARS-CoV-2 que se está realizando en el laboratorio de Poxvirus y Vacunas del CNB está siendo financiado por el CSIC (202020E84) y el Instituto de Salud Carlos III (COV20\_00151).

## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Los autores/as de este artículo declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente trabajo.

### Si desea citar nuestro artículo:

Esteban-Rodríguez M. y García-Arriaza J.F.  
Hacia la vacuna española contra el SARS-CoV-2  
ANALES RANM [Internet]. Real Academia Nacional de Medicina de España;  
An RANM · Año 2020 · número 137 (02) · páginas 234–238  
DOI: 10.32440/ar.2020.137.02.rev18