



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Evaluación preclínica y clínica de SOBERANA® 01. Candidato vacunal contra la COVID-19

Yanet Climent Ruiz ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2824-6374>
Darielys Santana Mederos ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5333-554X>
Sonia Pérez Rodríguez ³ <https://orcid.org/0000-0002-0755-6373>
Meiby de la Caridad Rodríguez González ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4205-0415>
Dagmar García Rivera ¹ <https://orcid.org/0000-0002-2099-1791>
Belinda Sánchez Ramírez ² <https://orcid.org/0000-0002-8683-385X>
Yury Valdés Balbín ¹ <https://orcid.org/0000-0002-0638-3896>
Vicente Vérez Bencomo ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5596-6847>
Laura M. Rodríguez Noda ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0171-4681>
Rocmira Pérez Nicado ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1657-6130>
Rolando Ochoa Azze ¹ <https://orcid.org/0000-0002-8008-2944>
Tammy Boggiano Ayo ² <https://orcid.org/0000-0002-6676-2011>
Carmen María Valenzuela Silva ^{1,5} <https://orcid.org/0000-0002-1082-2089>
Humberto González Rodríguez ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5855-1620>
Ubel J. Ramírez González ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0435-3949>
Beatriz Paredes Moreno ¹ <https://orcid.org/0000-0003-2034-6773>
Daniel García Rivera ⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5538-1555>
Claudia Labrada Regalado ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3237-2063>
Tays Hernández García ² <https://orcid.org/0000-0001-8414-0040>
Enrique Noa Romero ⁶ <https://orcid.org/0000-0003-2625-0228>
Marianniz Díaz Hernández ² <https://orcid.org/0000-0003-1177-2711>
Ivette Orosa Vázquez ² <https://orcid.org/0000-0003-3818-3271>
Gretchen Bergado Báez ² <https://orcid.org/0000-0003-2723-5566>
Franciscary Pi Estopiñán ² <https://orcid.org/0000-0002-6407-3327>
Tamara Hernández Salazar ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4311-2881>
Mildrey Fariñas Medina ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6530-9904>
Juliet María Enriquez Puertas ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-3951-2498>
Nibaldo Luis González Sosa ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-8665-4413>
Carlos A. González Delgado ³ <https://orcid.org/0000-0002-8482-8950>
Jorman Rubino Moreno ³ <https://orcid.org/0000-0002-2944-2553>
Alina Díaz Machado ³ <https://orcid.org/0000-0002-3672-5914>
Yunior González Freire ³ <https://orcid.org/0000-0002-3301-2599>
Yudisleidy Esmoris Mena ³ <https://orcid.org/0000-0003-3172-0994>
Lilia Beatriz Rosales Gil ³ <https://orcid.org/0000-0002-9574-4592>
Yanet Chappi Estévez ⁷ <https://orcid.org/0000-0002-1457-1678>
Mayté Amoroto Roig ⁷ <https://orcid.org/0000-0001-8148-1106>
Marisel Martínez Pérez ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6585-5454>
Ivis Ontiveiro Pino ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6684-8026>
Mario Landys Chovel Cuervo ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6991-7007>
Raine Garrido Arteaga ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6987-2814>
Félix Cardoso San Jorge ¹ <https://orcid.org/0000-0003-2540-7934>
Raúl González Mugica Romero ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6445-5501>
Sonsire Fernández Castillo ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5329-5971>
Eduardo Ojito Magaz ² <https://orcid.org/0000-0001-7300-2478>
Fabrizio Chiodo ^{8,9} <https://orcid.org/0000-0003-3619-9982>
Francoise Paquet ¹⁰ <https://orcid.org/0000-0001-8838-3445>
Cheng Fang ¹²
Guang-Wu Chen ¹¹

¹ Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba

² Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba

³ Centro Nacional de Toxicología. La Habana, Cuba

⁴ Facultad de Química, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

⁵ Instituto de Cibernética, Matemática y Física, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

⁶ Centro de Investigaciones de la Defensa Civil. La Habana, Cuba

⁷ Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. La Habana, Cuba

⁸ Centros Médicos de la Universidad de Amsterdam, Universidad Libre de Amsterdam. Amsterdam Holanda

⁹ Instituto de Química Biomolecular, Consejo Nacional de Investigación. Nápoles, Italia

¹⁰ Centro de Biofísica Molecular, Orleans, Francia

¹¹ Chengdu Olisynn Biotech. Chengdou, China

¹² Shanghai Fenglin Glycodrug Promotion Center, Shanghai, China

*Autor para la correspondencia: ycliment@finlay.edu.cu

Revisores ^a

María Guadalupe Guzmán
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.
La Habana, Cuba

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

a N. del E: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato.

RESUMEN

Introducción: SOBERANA® 01 se desarrolló en el Instituto Finlay de Vacunas para el enfrentamiento a la epidemia causada por el virus SARS-CoV-2. Este candidato se basa en el dominio de unión al receptor en forma dimerica, combinado con vesículas purificadas de membrana externa de meningococo del serogrupo B como inmunopotenciador de la respuesta inmune adsorbidos en hidróxido de aluminio.

Métodos: Se diseñó el antígeno con la peculiaridad de tener una cisteína libre en la posición 538, que permite la formación de dímeros del dominio de unión al receptor. En estudios preclínicos se evaluó la inmunogenicidad del dímero combinado con las vesículas de membrana externa y se realizaron estudios toxicológicos. Además, se diseñó un estudio clínico fase I en sujetos de 19 años a 59 años. **Resultados:** La presentación antigénica en forma de dímero combinado con las vesículas demostró ser segura e inmunogénica en modelos animales observando un incremento significativo de la respuesta inmune cuando se compara con la forma monomérica. Durante la evaluación clínica fase I, que incluyeron sujetos aparentemente sanos de entre 19 años y 59 años de edad, se demostró que SOBERANA® 01 conduce a un aumento importante en la respuesta de anticuerpos neutralizantes en comparación con el uso de hidróxido de aluminio como único adyuvante. Después de la tercera dosis, el 100 % de los sujetos seroconvirtieron en el grupo inmunizado con SOBERANA® 01. **Conclusiones:** Se demostró la inmunogenicidad y la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por SOBERANA® 01. El análisis de los sueros de las personas vacunadas demostró que la formulación que contiene las vesículas de membrana externa provoca un efecto neutralizante más potente contra varios mutantes del dominio de unión al receptor presentes en los COV, incluidos los mutantes triples del dominio de unión al receptor de la variante Beta.

Palabras clave: COVID-19; SARS-CoV-2; vacunas; anticuerpos neutralizantes

Preclinical and clinical evaluation of SOBERANA® 01. Vaccine candidate against COVID-19

ABSTRACT

Introduction: SOBERANA® 01 was developed at the Finlay Vaccine Institute to combat the epidemic caused by the SARS-CoV-2 virus. This candidate is based on the Receptor Binding Domain (RBD) in dimeric form combined with purified vesicles

from outer membrane of serogroup B meningococcus as immunopotentiator of the immune response adsorbed on aluminum hydroxide. **Methods:** The antigen was designed with the peculiarity of having a free cysteine at position 538, which allows the formation of RBD dimers. In preclinical studies it was evaluated the immunogenicity of the dimer combined with the outer membrane vesicles and they were performed toxicological studies. In addition, it was designed a Phase I clinical study in subjects from 19 to 59 years old. **Results:** The antigenic presentation in the form of dimer combined with the vesicles proved to be safe and immunogenic in animal models, observing a significant increase in the immune response when compared to the monomeric form. During the Phase I clinical evaluation, which included apparently healthy subjects between the ages of 19 and 59, it was demonstrated that SOBERANA® 01 lead to a significant increase in the neutralizing antibody response compared to the use of aluminum hydroxide as the sole adjuvant. After the third dose, 100% of the subjects seroconverted to the group immunized with SOBERANA® 01. **Conclusions:** It was demonstrated the immunogenicity and neutralizing capacity of the antibodies induced by SOBERANA® 01. The analysis of the sera of the vaccinated persons demonstrated that the formulation containing the OMVs causes a more potent neutralizing effect against several RBD mutants present in VOCs, including the RBD triple mutants of the beta variant.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Vaccine; Neutralizing antibodies

INTRODUCCIÓN

La información científica acumulada sobre las características del virus, la fisiopatología de la enfermedad, así como la respuesta inmune en pacientes recuperados, aportaron las evidencias acerca de la relevancia del uso del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del virus como principal antígeno vacunal para el desarrollo de los candidatos vacunales de subunidad protéica. Este dominio de la proteína S del virus es un fragmento de aproximadamente 193 aminoácidos, que constituye la región por la cual interacciona con el receptor ACE2 y juega un papel fundamental en la entrada a las células del huésped. ⁽¹⁻⁴⁾ Se han implementado diferentes estrategias para incrementar la inmunogenicidad del RBD, una de ellas es la presentación del antígeno de forma dimérica, diseñado intencionalmente con una cisteína libre que permite la unión de 2 moléculas de RBD monoméricas mediante 1 enlace disulfuro, la segunda es la adición de las vesículas de membrana externa (VME) como potente adyuvante con el objetivo de incrementar la respuesta inmune inducida por el candidato vacunal.

La mayoría de los inmunopotenciadores de la respuesta inmune son derivados de patógenos que presentan en su superficie patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) cuyo reconocimiento por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*) activan un grupo de señales intracelulares que traen como consecuencia la producción de citocinas como el interferón y la inducción

de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana, asociada con el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa óptima antígeno específica. ⁽⁵⁾ Los sistemas de liberación de antígenos localizan los componentes vacunales y los hacen diana de las células presentadoras de antígenos (CPA), y son generalmente particulados. Algunos incluso comparten ambos mecanismos de acción. ^(6,7) La acción polarizadora vendría dada por la capacidad del adyuvante de dirigir la respuesta hacia los mecanismos de protección de cada germen. ⁽⁸⁻¹²⁾

La presencia de PAMP en las membranas bacterianas hace de éstas una fuente importante de productos con potencial capacidad adyuvante. ⁽¹³⁻¹⁶⁾ De la membrana externa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B se deriva las VME que constituye el antígeno principal de la vacuna cubana VAMENGOC-BC® contra el meningococo B. ⁽¹⁷⁾ Estas vesículas contienen varios componentes con diferentes PAMP en su estructura entre los que se encuentran el lipopolisacárido (LPS) nativo y las porinas. ⁽¹⁸⁻²¹⁾ Las propiedades inmunogénicas de las VME han sido extensivamente estudiadas y se ha demostrado su capacidad de activar un patrón preferencial de respuesta inmune celular Th1. ⁽²²⁻²⁴⁾

Las VME han mostrado gran capacidad adyuvante al ser conjugadas a Ag importantes para otras enfermedades. Por ejemplo, al conjugar el polisacárido tipo B de *Haemophilus influenzae* a las VME se indujeron anticuerpos protectores en ratones jóvenes. En ese estudio se demostró que tanto el

tamaño del bazo como el número de esplenocitos en él fue mayor en los ratones inmunizados. Además, los análisis inmunohistoquímicos demostraron que este incremento en la talla del bazo se debía a un aumento en el número de macrófagos en él, lo cual podría ser la explicación de la capacidad adyuvante de las VME en esa preparación. ⁽²⁵⁾

La plataforma tecnológica de adyuvantes para vacunas humanas más utilizada en Cuba se basa precisamente en la tecnología de obtención de las VME a partir de la cepa CU-B385/83 de *N. meningitidis*. Esta tecnología, que se empleó para producir más de 70 millones de dosis de la vacuna antimeningocócica, generó una familia de patentes, nuevas vacunas y oportunidades de desarrollo biomédico y biotecnológico. Una nueva vacuna terapéutica antialérgica (PROLINEM-DS), actualmente en desarrollo clínico, usa la tecnología vesicular como adyuvante vacunal. Vacunas terapéuticas en desarrollo contra diferentes tipos de cáncer (por ejemplo, CIMAvax-EGF, indicada en el tratamiento de cáncer de pulmón) emplean también variantes de esta tecnología vesicular como adyuvante. ⁽²⁶⁾

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un candidato vacunal basado en el RBD dimérico combinado con ve-

sículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciador de la respuesta inmune y evaluar la seguridad e inmunogenicidad en estudios preclínicos y clínicos.

MÉTODOS

Evaluación preclínica

El dominio de unión al receptor en su forma dimérica (RBD-d) se separó del monómero mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) en una columna Superdex 200 (figura 1B). De acuerdo con los resultados de la dispersión de luz dinámica (DLS) indicó el mayor diámetro hidrodinámico del dímero RBD en comparación con el monómero. La reducción del dímero a monómero se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE) con una banda de aproximadamente 60 kDa en condiciones no reducidas y aproximadamente 30 kDa en condiciones reductoras. Las masas moleculares experimentales se determinaron por ESI-MS y corroboraron la estructura dimérica del RBD y la presencia de los puentes disulfuros.

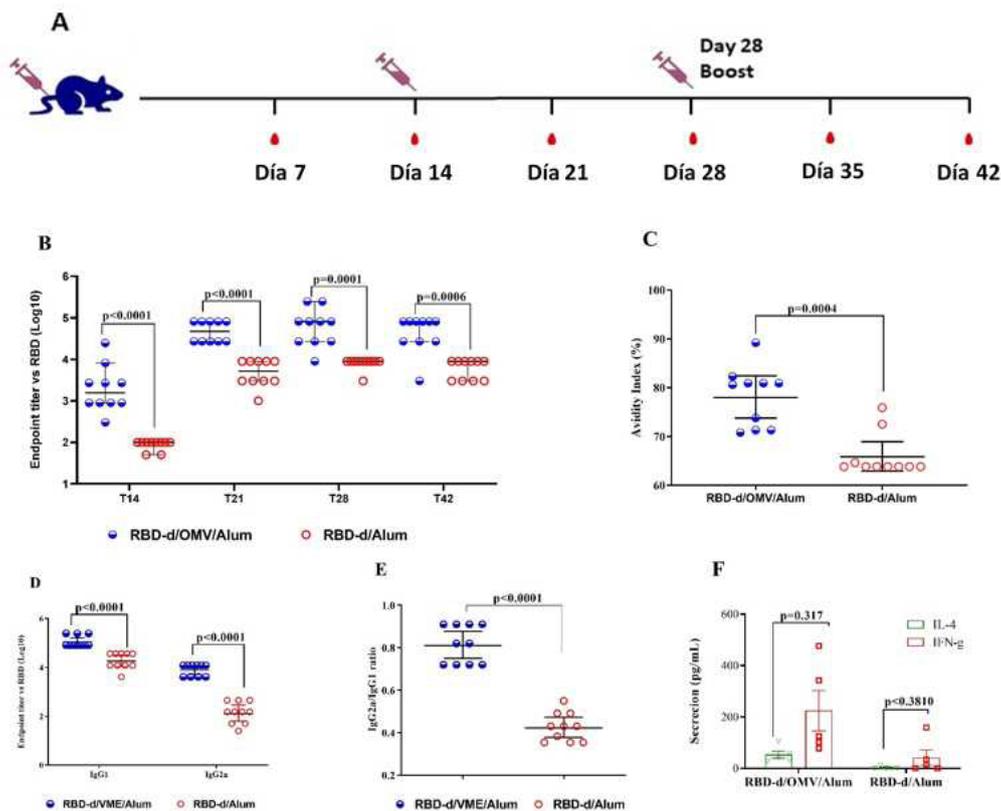


Fig. 1. Evaluación preclínica de inmunogenicidad. Inmunización de ratones BALB/c con RBD-d/OMV/Al(OH)₃ (azul) y RBD-d/ Al(OH)₃ (rojo). A) Esquema de vacunación; B) IgG específica anti-RBD; C) Índice de avidéz de anticuerpos obtenidos el día 42; D) IgG1 e IgG2a específicas anti-RBD; E) Relación IgG2a/IgG1 específica de RBD; F). Secreción de citocinas (IL-4 e IFN-γ).

Para confirmar la exposición correcta del motivo de unión al receptor (RBM) en el antígeno dimérico, analizamos por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) la interacción del RBD-d con el receptor ACE2 presente en la superficie de las células vero (ver figura 1E) o con ACE2 humano recombinantes (hACE2-Fc). Se prepararon 2 formulaciones diferentes: a) RBD-d/OMV/Al(OH)₃ (10 mg/4 mg/250 mg) y b) RBD-d/Al(OH)₃ (10 mg/250 mg). Se inmunizaron ratones Balb/c siguiendo un programa de 3 dosis (figura 2A). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las Directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Finlay de Vacunas y fueron aprobados por su Comité de Ética Animal.

Células B de memoria específicas de RBD

Hubo una diferencia entre RBD-d/OMV/Al(OH)₃ y RBD-d/Al(OH)₃ con respecto a la inducción de células B de memoria específicas de RBD. Como se muestra (figura 3A) los esplenocitos recolectados el día 42 de ratones inmunizados con estas formulaciones se transfirieron por vía intravenosa a ratones sin tratar que luego se reforzaron con 1 dosis única de 10 mg de RBD-d/Al(OH)₃.

Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos anti-RBD provocados medimos la inhibición de la interacción del receptor RBD-ACE2 en una prueba de neutralización de virus molecular (mVNT)³⁷ y una prueba de neutralización de virus convencional, cVNT50 (ver figura 3). La mVNT se basa en el bloqueo mediado por anticuerpos de la interacción RBD-hACE2, y es un sustituto *in vitro* de la prueba de neutralización del virus, detectando anticuerpos neutralizantes en poco tiempo.

Utiliza el Fc de ratón RBD recombinante (RBD-mFc) y el receptor hACE2-Fc de la célula huésped como antígeno de recubrimiento. El cVNT50, que evalúa la inhibición de la interacción entre el virus SARS-CoV-2 vivo y las células vero E6 portadoras de receptores ACE2.

Ensayo clínico fase I

Diseño del estudio y participantes

Este ensayo clínico de fase I aleatorizado, doble ciego, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Toxicología (CENATOX) en La Habana, Cuba. Se reclutaron 60 voluntarios cubanos de 19 años a 59 años, de ambos sexos que cumplían los

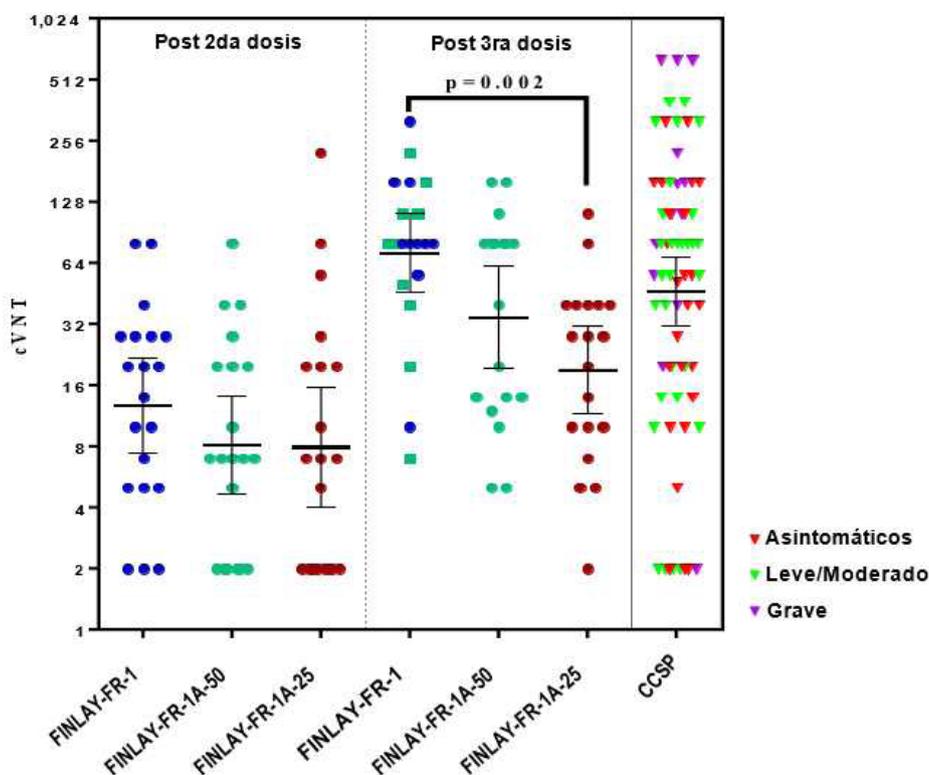


Fig. 2. Títulos de neutralización de virus vivos convencionales (cVNT) después de la segunda y tercera dosis con los candidatos vacunales del dominio de unión al receptor dimérico (d-RBD): FINLAY-FR-1 = dominio de unión al receptor dimérico (d-RBD, 50 µg) y vesículas de membrana de *Neisseria meningitidis* grupo B (20 µg) en gel de hidróxido de aluminio. FINLAY-FR-1A-50 = d-RBD (50 µg) en gel de hidróxido de aluminio. FINLAY-FR-1A-25 = d-RBD (25 µg) en gel de hidróxido de aluminio. FINLAY-FR-1 después de la tercera dosis = los círculos azules representan sujetos con horarios homólogos; los cuadrados verdes representan sujetos con horarios heterólogos. CCSP = panel de sueros convalécientes cubanos.

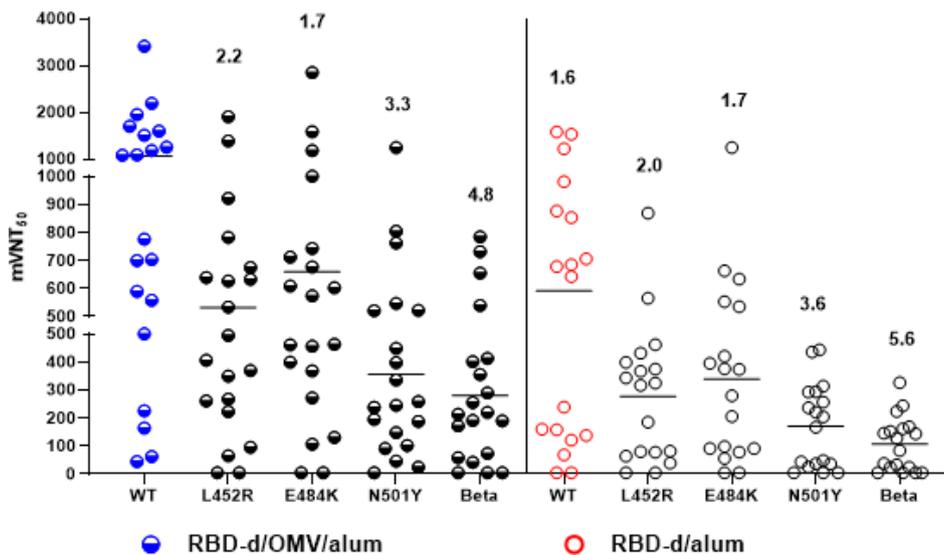


Fig. 3. Evaluación de inmunogenicidad de un ensayo clínico de fase I. Sujetos inmunizados con RBD- d/OMV (50 µg/20 µg, azul) frente a RBD-d (50 µg, rojo) adsorbido en hidróxido de aluminio (1250 µg). A) títulos de IgG anti-RBD. B) mVNT50 que representa la dilución de suero que da una inhibición del 50 % de la interacción RBD-ACE2. C) mVNT50 que compara la inhibición de la interacción entre fagos que muestran varios mutantes RBD y el receptor ACE2. Se representan las proporciones de inhibición entre el RBD de tipo salvaje (WT) y una variedad de mutantes de RBD para sueros de personas vacunadas con las formulaciones A y B.

criterios de selección. Los participantes se distribuyeron en 3 grupos (de 20 sujetos) para evaluar 2 candidatos vacunales: FINLAY-FR-1 (RBD-d/VME/Al(OH)₃) y FINLAY-FR-1A (RBD-d/VME/Al(OH)₃), este último a 2 concentraciones de d-RBD: 25 µg (FINLAY-FR-1A-25) y 50 µg (FINLAY-FR-1A-50).

Producto en evaluación

Antígeno vacunal

El dominio de unión al receptor del SARS-CoV-2 (secuencia: 319-541 residuos de aminoácidos), expresada en células CHO, purificada y caracterizada como de costumbre. La RBD se dimeriza a través de un puente disulfuro entre cadenas Cys538-Cys538. SOBERANA® 01 (candidato vacunal FINLAY-FR-1): d-RBD 50 µg, VME 20 µg, adyuvado en gel de hidróxido de aluminio 1,25 mg. SOBERANA® Plus (candidato vacunal FINLAY-FR-1A) se evaluó en 2 concentraciones de d-RBD. Composición por dosis (0,5 mL): d-RBD 50 µg o 25 µg, adyuvado en gel de hidróxido de aluminio 1,25 mg.

Después del examen médico los 60 participantes elegibles fueron asignados aleatoriamente a 1 de los 3 grupos de tratamiento. Todos los participantes recibieron 3 dosis de vacuna: los grupos FINLAY-FR-1 y FINLAY-FR-1A-50 fueron vacunados en los días T0 (inicial); segunda dosis el día 28 (T28) y tercera dosis entre 65 d y 73 d después de la segunda dosis. Para la tercera dosis, el grupo de SOBERANA® 01 se dividió aleatoriamente en 2 subgrupos de 10 participantes: 1 recibió SOBERANA® 01 (programa homólogo); el otro subgrupo re-

cibió SOBERANA® Plus (programa heterólogo). El grupo FINLAY-FR-1A-25 fue vacunado con 3 dosis: T0, T28 y T56.

Para las pruebas inmunológicas se tomaron muestras de sangre los 0 d (antes de la vacunación), T28, T56 y 28 d después de la tercera dosis. Para las pruebas de hematología y química sanguínea, se recolectaron muestras de sangre antes de la vacunación y 28 d después de la última dosis.

Los voluntarios fueron observados de cerca durante 3 h después de la vacunación. Después de cada dosis se realizó vigilancia activa los días 1 (vacunación), 2, 3 y 7 para todos los grupos. Para la vigilancia pasiva, se instruyó a los participantes para que completaran un registro diario de las reacciones adversas locales y sistémicas solicitadas durante el período de seguimiento. Se registraron las reacciones locales solicitadas y definidas en el protocolo y los síntomas sistémicos durante 7 d después de cada dosis. Todos los demás eventos se registraron durante todo el período de seguimiento. La gravedad de los eventos adversos locales y sistémicos previstos y definidos por el protocolo se clasificaron como leves, moderados y graves, de acuerdo con la definición de la Colaboración de Brighton y los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos, versión 5.0. La gravedad de los eventos adversos no solicitados se clasificaron como: leve (molestias transitorias o leves, sin interferencia con la actividad), moderada (limitación leve a moderada en la actividad) y severa (limitación marcada en la actividad).^(27,28) Se revisó la causalidad de todos los eventos adversos y los eventos

se clasificaron de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS): asociación causal inconsistente con la inmunización, asociación causal constante con la inmunización, indeterminada o inclasificable. ⁽²⁹⁾

La respuesta inmunitaria humoral basal y tras la vacunación en el ensayo fase I se evaluó mediante ELISA anti-RBD IgG cuantitativo indirecto interno, usando d-RBD como antígeno de recubrimiento. Este ensayo utiliza 1 suero estándar interno caracterizado, al que se le asignó arbitrariamente 200 AU/mL. La curva estándar se construyó realizando 6 diluciones seriadas dobles: de 1:100 a 1:1600. Las muestras de suero se diluyeron de 1:100 a 1:400. La concentración de IgG anti-RBD se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras de suero en la curva estándar construida utilizando la función log-logística de 4 parámetros. ⁽³⁰⁾

La prueba de neutralización molecular del virus basada en el bloqueo de la interacción RBD:hACE2 mediado por anticuerpos. Es un sustituto *in vitro* de la prueba de neutralización de virus vivo. Utiliza RBD-mouse-Fc recombinante (RBD-Fcm) y el receptor de la célula huésped hACE2-Fc (ACE2-Fch) como antígeno de recubrimiento. Los anticuerpos humanos contra RBD pueden bloquear la interacción de RBD-Fcm con ACE2-Fch. El RBD-Fcm que no fue inhibido puede unirse a ACE2-Fch, y es reconocido por un anticuerpo monoclonal anti- γ murino conjugado con fosfatasa alcalina. Se calculó la proporción de inhibición de la interacción RBD:hACE2 a una dilución sérica de 1:100 y los títulos de neutralización de virus molecular medio máximos (mVNT50). ⁽³¹⁾

La prueba convencional de neutralización de virus vivo es el estándar de oro para determinar la eficacia de los anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Es un ensayo colorimétrico basado en la neutralización de anticuerpos del efecto citopático del virus vivo SARS-CoV-2 en células Vero E6. Se calcularon los títulos convencionales de neutralización de virus vivo (cVNT). ⁽³²⁾

Se comparó la respuesta inmune humoral provocada por la vacuna con la del Panel de Sueros de Convalecientes Cubanos (CCSP), compuesto por 68 muestras de suero de individuos asintomáticos, pacientes recuperados de COVID-19 con sintomatología leve o moderada y con sintomatología graves de COVID-19. ^(13,30)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño y evaluación preclínica del candidato vacunal SOBERANA® 01

La estrategia de evaluación no clínica de SOBERANA® 01 estuvo dirigida a demostrar la superioridad del RBD dimérico en comparación con la forma monomérica de la proteína, así como a la capacidad adyuvante de las VME de *Neisseria meningitidis* y a la inducción de un patrón Th1.

Con el empleo de la tecnología de ADN recombinante se expresó la molécula RBD, en la línea celular CHO K1, que comprende desde los residuos Arg 319 hasta Phe 541 con 6 residuos adicionales de His en su extremo C terminal para facilitar el proceso de purificación. Esta región contiene además 4 enlaces disulfuro intramoleculares y 4 sitios de glicosilación (2 N y 2 O). Además, la secuencia aminoacídica tiene la peculiaridad de tener 1 cisteína libre en la posición 538, que permite la formación de dímeros de RBD.

Mediante ESI-MS se identificaron las señales correspondientes a los 4 enlaces disulfuro intramoleculares (C336-C361, C379-C432, C391-C525, C480-C488), y 1 puente disulfuro intermolecular (C538-C538) y los péptidos con O-glicosilación en la región N-terminal y se verificó la secuencia completa de la proteína.

Para demostrar la actividad biológica se evaluó el reconocimiento específico de la molécula de RBD por su receptor ACE2. La proteína RBD en forma dimérica mostró mayor afinidad por el receptor ACE2 en comparación con el RBD monomérico, además de ser reconocido por sueros de sujetos convalecientes de la enfermedad lo que corrobora la capacidad antigénica del RBD dimérico.

En los estudios inmunológicos en modelos animales se evaluaron 2 formulaciones diferentes con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune inducida por el dímero RBD y la presencia o no de VME, (ver figura 1A). Se demostró que la formulación que contenía el dímero RBD combinado con VME indujo una respuesta de IgG más fuerte ya en el día 14 en comparación con la que no tenía VME, con un incremento significativo en los títulos de IgG en todos los tiempos evaluados (ver figura 1B). Además, se observó un aumento en el índice de avidéz (ver figura 1C), con valores superiores al 80 %, para la formulación que contiene además las VME (RBD-d/VME/Al(OH)₃). De manera similar, tanto IgG1 (5,05 frente a 4,27) como IgG2a (3,89 frente a 2,15) fueron superiores para la formulación RBD-d/VME/Al(OH)₃ (ver figuras 1D y 1E).

La inducción de células B de memoria es 1 de los objetivos fundamentales a la hora de diseñar un candidato vacunal. Los resultados obtenidos después de evaluar los esplenocitos tomados el día 42 de ratones inmunizados mostraron títulos tan altos como 102 a 103 después de 7 d para la formulación RBD-d/VME/Al(OH)₃ (ver figura 1F).

La variable principal a evaluar en una vacuna es la inducción de anticuerpos neutralizantes del virus vivo. Estos anticuerpos deben ser capaces de bloquear la interacción entre el virus y su receptor celular ACE2. La funcionalidad de los anticuerpos inducidos se demostró midiendo la inhibición de la interacción del receptor RBD-ACE2 en 1 prueba de neutralización molecular (mVNT) y 1 prueba de neutralización de virus convencional (cVNT50) con el virus vivo. Los sueros de

ratones inmunizados con la formulación RBD- d/VME/Al(OH)₃ mostraron una inhibición mayor y más uniforme que la formulación que no contiene las VME. La mVNT50, también dio como resultado una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por RBD-d/VME/Al(OH)₃ en comparación con RBD-d/Al(OH)₃.

En los estudios toxicológicos realizados se pudo demostrar que el candidato vacunal SOBERANA® 01 es seguro luego de la administración de 5 dosis, las cuales representaron más de 100 veces la dosis humana en cada administración y el 250 % de la dosis humana en su conjunto. No se observaron signos clínicos, efectos de dolor, ni muertes durante el ensayo a causa de los productos, que indicaran toxicidad. El peso corporal de los animales, así como el consumo de agua y alimentos no mostraron diferencias entre grupos de tratamientos que indicaran toxicidad del producto evaluado. Los parámetros bioquímicos sanguíneos evaluados y la hemoglobina se mantuvieron en los rangos fisiológicos y no se observaron alteraciones anatomopatológicas de valor tóxico en los análisis macroscópicos.

Evaluación clínica fase I del candidato vacunal SOBERANA® 01

Durante el ensayo clínico fase I se demostró la seguridad del candidato vacunal SOBERANA® 01 en sujetos de 19 años a 59 años de edad. En total se reportaron 31 tipos diferentes de eventos adversos en el 80 % de los participantes para un total de 170, sin diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento evaluados. El 63,5% de los eventos adversos reportados fueron de intensidad leve, 58,8 % clasificados como solicitados y 61,8 % como locales. El 69,4 % tuvo asociación causal con la vacunación predominando el dolor en el sitio de vacunación. La mayoría de los eventos adversos aparecieron en las primeras 24 h y el 59,6 % duraron menos de 24 h. No se encontraron eventos adversos graves, solo 4 (2,4 %) fueron severos.

Al analizar las variables inmunológicas en los sujetos vacunados se pudo demostrar el incremento de la seroconversión anti-RBD, con tasas que aumentaron progresivamente según el número de dosis de vacuna aplicada a cada sujeto, hasta alcanzar valores de 100 % en el grupo tratado con SOBERANA® 01 y del 94,4 % para el grupo tratado con la formulación sin VME.

La capacidad de bloquear la interacción RBD:hACE2 aumentó notablemente tras la segunda dosis. Se observó un impacto significativo de la tercera dosis ($p < 0,0001$), con valores medianos superiores a los de la segunda dosis y a los del panel de convalcientes cubanos (CCSP) empleado como comparador de la respuesta inmune. Todos los voluntarios vacunados con los esquemas completos de SOBERANA® 01 (FINLAY-FR-1) lograron una inhibición de RBD:hACE2 superior al valor medio de CCSP.

La neutralización molecular media máxima (mVNT50) también mostró un aumento significativo en los niveles de anticuerpos funcionales después de la tercera dosis ($p < 0,001$), que fue mayor en el grupo vacunado con SOBERANA® 01 ($p = 0,028$).

La prueba de oro resulta la neutralización viral. Se detectaron niveles de anticuerpos neutralizantes de virus vivos después de la segunda dosis en el 85 % de los sujetos vacunados con SOBERANA® 01 que llegaron a valores de 100 % después de la tercera dosis. La GMT de anticuerpos neutralizantes de virus vivo después de la tercera dosis aumentó significativamente en el grupo vacunado con ambos esquemas FINLAY-FR-1 con respecto a las otras formulaciones ($p = 0,002$) y al CCSP (ver figura 2).

Con los sueros de los sujetos vacunados se evaluó el efecto neutralizante contra 1 variedad de mutantes de RBD presentes en las variantes de preocupación (VOC) del SARS-CoV-2, en comparación con el RBD de tipo salvaje. Se empleó la tecnología de visualización de fagos para expresar diferentes mutantes simples de RBD, es decir, L452R, E484K y N501Y, así como la variante Beta SARS-CoV-2 (B.1.351) que presenta mutaciones K417N, E484K y N501Y en el RBD. Los fagos que expresan RBD se usaron directamente en 1 prueba de neutralización de virus molecular. Como se muestra (ver figura 3) la neutralización de anticuerpos, determinada como ID50, fue mayor para los sueros de personas vacunadas con la formulación que contiene VME en el tipo salvaje y todos los demás fagos que muestran los mutantes RBD.

Las vacunas basadas en proteínas recombinantes, aunque producen pocos eventos adversos, resultan poco inmunogénicas, de ahí la importancia de evaluar potentes adyuvantes que incrementen la respuesta inmune deseada. ⁽³³⁾ Las VME de N. meningitidis se han evaluado como inmunopotenciadoras de la respuesta inmune en varios candidatos vacunales demostrando su capacidad adyuvante, es por eso que se diseñó el candidato vacunal SOBERANA® 01 que incluye las VME, que unido a la presentación en forma de dímero del RBD, incrementa significativamente la respuesta inmune en los vacunados.

Las VME estimulan la producción de IFN γ , interleuquinas y citoquinas proinflamatorias, además de inducir respuesta de células T. Una de las ventajas fundamentales del uso de las VME es que estimulan la inmunidad innata, activan las células presentadoras de antígenos lo que tiene como resultado la activación de las células T CD4+ causando una respuesta inmune con predominio del patrón Th1. ⁽⁹⁾ Al aplicar SOBERANA® 01 se observó la inducción de altos títulos de anticuerpos específicos anti RBD con demostrada funcionalidad, mediada por la presencia de anticuerpos neutralizantes. Al evaluar la inhibición de la interacción RBD:hACE2 en suero de sujetos

vacunados se encontraron altos valores de inhibición, superiores también al panel de convalecientes cubanos.

Los estudios preclínicos y clínicos demostraron el importante papel de las VME en la inducción de la respuesta inmune funcional, especialmente caracterizada por la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sujetos vacunados con la formulación que combina el RBD dimérico y las VME. Los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron mayores que los reportados para otras vacunas de virus inactivado y algunas vacunas basadas en vectores adenovirales.⁽³³⁻³⁶⁾

Conclusiones

Se demostró la inmunogenicidad y la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por la formulación basada en la proteína RBD en forma dimérica y VME de *N. meningitidis* adsorbida en hidróxido de aluminio. Una de las ventajas de este candidato vacunal es la presentación bivalente del RBD, que exponen bien sus motivos de unión al receptor y conservan las propiedades antigénicas, pero al mismo tiempo, esta presentación multivalente contribuye a la mayor respuesta humoral y a la funcionalidad de los anticuerpos. La capacidad adyuvante de la VME en la formulación incrementa la inmunogenicidad del antígeno vacunal; de ahí el mayor número de individuos que respondieron en la evaluación preclínica y clínica preliminar en humanos. El análisis de los sueros de las personas vacunadas demostró que la formulación que contiene las VME provoca un efecto neutralizante más potente contra varios mutantes RBD presentes en los COV, incluidos los mutantes triples RBD de la variante *Beta*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quinlan Brian D, Mou Huihui, Zhang Lizhou and Guo Yan, He Wenhui, Ojha Amrita, Parcels Mark S, Luo Guangxiang, Li Wenhui, Zhong Guocai, Hyeryun C, Farzan M. The SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain Elicits a Potent Neutralizing Response Without Antibody-Dependent Enhancement. [Internet]; Disponible en SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3575134> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3575134>
2. Zang J, Gu C, Zhou B, Zhang C, Yang Y, Xu S, Bai L, Zhang R, Deng Q, Yuan Z, Tang H, Qu D, Lavillette D, Xie Y, Huang Z. Immunization with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 elicits antibodies cross-neutralizing SARS-CoV-2 and SARS-CoV without antibody-dependent enhancement. *Cell Discov*. [Internet] 2020 [citado en 3 sep y año];6:61. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00199-1>. PMID: 32901211; PMCID: PMC7471522.
3. Ravichandran S, Coyle E, Klenow L *et al*. Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits. *Science Translational Medicine Science Translational Medicine*. [Internet] 2020 [citado en jul]; (12): Issue 550. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3539>
4. Dai L, Zheng T, Xu K *et al*. A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*. [Internet] 2020 [citado 6 ago, 2020];182(3):722-33.e11. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035> . Epub 2020 Jun 28. PMID: 32645327; PMCID: PMC7321023.
5. Pérez O, Lastra M *et al*. Natural Neisseria derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. *Pharmacologyonline* 2006;3:762-4.
6. Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*. [Internet] 2012;11(2):237-56. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1586/erv.11.189>
7. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(9):727-35.
8. Bramwell VW, Perrie Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006;58(6):717-28.
9. Pérez O, Batista A *et al*. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2012;45(8):681-92.
10. Spranger S, Miran Javorovic *et al*. Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. *The Journal of Immunology*. 2010;185(1):738-47.
11. Okada H, Pawel Kalinski *et al*. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(3):330.
12. Won-Jung L, Seungbin Chaa *et al*. Induction of Th1 polarized immune responses by thiolated Eudragit-coated F4 and F18 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. 2011;79(2):226-31.
13. Zhang B, Hu Y *et al*. Mapping the Immunodominance Landscape of SARS-CoV-2 Spike Protein for the Design of Vaccines against COVID-19. Preprint from bioRxiv, [Internet] 2020 [citado 24 abr 2020]; Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.056853> PPR: PPR154534.47
14. Clifford V Harding, Lakshmi Ramachandra M *et al*. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Current opinion in immunology*. 2003;15(1):112-9.
15. Miyaji EN, Carvalho E *et al*. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011;44(6):500-13.
16. Demento SL, Siefert A *et al*. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends in biotechnology*. 2011;29(6):294-306.
17. Sierra G, Campa HC *et al*. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH annals*. 1991;14(2):195-207.
18. Qingqi J, Sachiko A *et al*. Cutting edge: lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- κ B. *The Journal of Immunology*. 2000;165(7):3541-4.
19. Massari P, Henneke P *et al*. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *The Journal of Immunology*. 2002;168(4):1533-7.

20. Dixon GL, Newton PH *et al.* Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4351-7.
21. Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2001;19(11-12):1327-46.
22. Del Campo J, Zayas C *et al.* Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods*. 2009;49(4):301-8.
23. Pérez O, Lastre M *et al.* Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4502-8.
24. Kolb-Mäurer A *et al.* Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infection and immunity*. 2001;69(11):6912-22.
25. Ambrosino D, Bolon D *et al.* Effect of *Haemophilus influenzae* polysaccharide outer membrane protein complex conjugate vaccine on macrophages. *The Journal of Immunology*. 1992;149(12):3978-83.
26. Sierra-González VG. Cuban Meningococcal Vaccine VA-MEN-GOC-BC: 30 Years of Use and Future Potential. *MEDICC review*. 2019;21:19-27.
27. Brighton Collaboration. Case definitions. Basel: BC; 2021. [Internet] 2021 [citado en 10 ago 2021]; Disponible en: <https://brighton-collaboration.us/category/pubs-tools/case-definitions/>
28. US Department of Health and Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 5.0. Washington: HHS; 2017. [Internet] 2021 [citado en 10 ago 2021]; Disponible en: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_50
29. World Health Organization. Causality Assessment of an Adverse Event Following Immunization (AEFI). 2nd Edition. Geneva: WHO; 2018.
30. Plikaytis BD, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual. Version 2.0. Atlanta, GA, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
31. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MIC, Tiu C, *et al.* A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38:1073-8.
32. Manenti A, Maggetti M, Casa E, Martinuzzi D, Torelli A, Trombetta CM, *et al.* Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a CPE-based colorimetric live virus micro-neutralization assay in human serum samples. *J. Med. Virol.* 2020; 92(10):2096-104. Disponible en: <https://www.doi.org/10.1002/jmv.25986>
33. Alturki SO, Alturki-Sawsan O, Connors J, Cusimano G, Kutzler MA, Izmirlly AM *et al.* The 2020 pandemic: current SARS-CoV-2 vaccine development Disponible en: *Front Immunol* 2020;11. Disponible en: <https://www.doi.org/doi:10.3389/fimmu>. 2020.01880.
34. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. Target product profile analysis of COVID-19 vaccines in phase III clinical trials and beyond: an early 2021 perspective Available from. *Viruses* 2021;13:418. Disponible en: <https://www.doi.org/10.3390/v13030418>
35. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. Target product profile analysis of COVID-19 vaccines in phase III clinical trials and beyond: an early 2021 perspective Available from. *Viruses* 2021;13:418. Disponible en: <https://www.doi.org/10.3390/v13030418>
36. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *Lancet* 2020; 396:467-78. Disponible en: [https://www.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://www.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)

Recibido: 15/10/2023

Aprobado: 20/11/2023

Ensayo clínico

Fase I: Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos, WHO-ICTRP: <https://rpcec.sld.cu/ensayos/RPCEC00000338-Sp>.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses económicos. Algunos de los autores son coinventores de una patente provisional de vacuna contra el SARS-CoV-2 basada en estos resultados.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Vicente Guillermo Verez Bencomo, Dagmar García Rivera, Yury Valdés Balbín, Yanet Climent Ruiz

Análisis formal: Yanet Climent Ruiz, Darielys Santana Mederos, Laura M. Rodríguez Noda, Rocmira Pérez Nicado, Carmen Valenzuela Silva, Rolando Ochoa Azze

Investigación: Yanet Climent Ruiz, Darielys Santana Mederos, Sonia Pérez Rodríguez, Meiby de la Caridad Rodríguez González, Belinda Sánchez Ramírez, Laura M. Rodríguez Noda, Rocmira Pérez Nicado, Rolando Ochoa Azze, Beatriz Paredes Moreno, Daniel García Rivera, Claudia Labrada Regalado, Tays Hernández García, Enrique Noa Romero, Marianniz Díaz Hernández, Ivette Orosa Vázquez, Gretchen Bergado Báez, Franciscary Pi Estopiñán, Tamara Hernández Salazar, Mildrey Fariñas Medina, Juliet Enriquez Puertas, Nibaldo Luis González Sosa, Carlos A. González Delgado, Jorman Rubino Moreno, Alina Díaz Machado, Yuniór González Freire, Yudisleidy Esmoris Mena, Lilia Beatriz Rosales Gil, Yanet Chappi Estévez, Mayté Amoroto Roig, Marisel Martínez Pérez, Ivis Ontiveiro Pino, Mario Landys Chovel Cuervo, Raine Garrido Arteaga, Félix Cardoso San Jorge, Raúl González Mugica Romero, Sonsire Fernández Castillo, Eduardo Ojito Magaz, Fabrizio Chiodo, Françoise Paquet, Cheng Fang, Guang-Wu Chen

Metodología: Vicente Guillermo Verez Bencomo, Dagmar García Rivera, Yury Valdés Balbín, Yanet Climent Ruiz, Humberto González Rodríguez, Ubel J. Ramírez González, Laura M. Rodríguez Noda, Rocmira Pérez Nicado, Belinda Sánchez Ramírez, Tammy Boggiano Ayo, Sonia Pérez Rodríguez, Meiby de la Caridad Rodríguez González

Administración del proyecto: Yanet Climent Ruiz

Visualización: Yanet Climent Ruiz

Redacción-borrador original: Yanet Climent Ruiz, Rolando Ochoa Azze, Vicente Guillermo Verez Bencomo, Dagmar García Rivera

Redacción-revisión y edición: Yanet Climent Ruiz, Rolando Ochoa Azze

Financiamientos

Para la realización de este estudio se recibió financiamiento del Fondo de Ciencia e Innovación (FONCI) del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (Proyecto-2020-20). El diseño del estudio, análisis de los datos resultantes, interpretación y redacción de informes se llevó a cabo por Investigadores del Instituto Finlay de

Vacunas, el centro patrocinador. Investigadores del CENATOX y otras instituciones participantes fueron responsables de la ejecución del ensayo clínico y la recopilación de datos. Contribuyeron al análisis e interpretación de datos. Una Junta Independiente de Monitoreo de Seguridad y Datos supervisó durante todo el ensayo.

Cómo citar este artículo

Climent Ruiz Y, Santana Mederos D, Pérez Rodríguez S, Rodríguez González MC, García Rivera D, Sánchez Ramírez B *et al*. Evaluación preclínica y clínica de SOBERANA® 01. Candidato vacunal contra la COVID-19. An Acad Cienc Cuba [Internet] 2023 [citado en día, mes

y año]; No. Vol):e1512. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1512>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.





