



**Cinvestav DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
Y ESTUDIOS AVANZADOS**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Evaluación de la inmunogenicidad de las  
proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS  
CoV-2 en un modelo murino”**

**TESIS**

Que presenta

**Q.F.B. Noe Juvenal Mendoza Ramírez**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

**Dra. Leticia Cedillo Barrón**

Ciudad de México

AGOSTO,2021

**ASESORES:**

**DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO**

INVESTIGADOR TITULAR NIVEL 3E

DEPARTAMENTO DE BIOMECIDINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

**DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE**

INVESTIGADOR TITULAR NIVEL 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMECIDINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

**DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CAZÁRES**

INVESTIGADORA TITULAR NIVEL 3D

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIONGENIERÍA

CINVESTAV-IPN

**DR. EDGAR MORALES RÍOS**

INVESTIGADOR TITULAR NIVEL 3A

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

CINVESTAV-IPN

## **Agradecimientos.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por otorgarme la beca con el número de apoyo 1008721 que me permitió realizar mis estudios de maestría en el departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón. Por aceptarme en su equipo de trabajo y por toda su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Julio García Cordero. Por ser mi sensei en el laboratorio. Por enseñarme a trabajar correctamente, por todos sus tips y consejos durante el desarrollo experimental de este proyecto. Por darme ánimos y no dejar que me diera por vencido. Por impulsarme a ser mejor persona y por brindarme su amistad.

A Sandra Paola. Por ser mi amiga desde el curso propedéutico, fuimos los sobrevivientes del equipo 4. Por todo su apoyo en la parte experimental, por llenar el laboratorio siempre de la mejor energía y optimismo. Y, sobre todo, por creer siempre en mí.

Al Dr. Edgar Morales Ríos. Por su asesoría y apoyo durante la producción de las proteínas recombinantes. Estas proteínas fueron los pilares de este proyecto. Y por todas sus observaciones durante la redacción de esta tesis.

A los Drs. David Fernández Benavidez y Juan Manuel Alvarado Orozco del Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI). Por aportar el financiamiento para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cazáres. Por su apoyo en la evaluación de anticuerpos neutralizantes. Y a su auxiliar el M.C. Leandro Alberto Núñez Muñoz por realizar estos ensayos.

Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete. Por sus comentarios durante la redacción de la tesis y por siempre obligarme a pensar.

Al Dr. Jesús Hernández López. Por donarnos la línea celular Expi293 y por apoyarnos en evaluar la actividad neutralizante de los sueros de ratones. A su alumna Diana Hinojosa Trujillo por ser quien realizó dichos ensayos.

A los/las M.C. Daniela Roa Velázquez, Jessica Filisola Villaseñor y Gabriel Marcelino Pérez. Por compartir todo su conocimiento en el tema de purificación de proteínas. Por todo su apoyo en los procesos de purificación y por su amistad.

Al Dr. Rosendo Luria Pérez. Por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar la parte final de mi proyecto.

A la M.C. Paola Muñoz López. Por todo su apoyo para la realización de los ensayos de CBAs. Por mostrar siempre la mejor disposición para ayudar y por compartir todo su conocimiento.

Al Dr. José Bustos Arriaga. Quién con el apoyo del Instituto de Enfermedades Respiratorias nos proporcionó las células Vero infectadas con SARS CoV-2.

A la M.C. Paola Briseño Díaz. Por apoyarme con los anestésicos para los ratones y su ayuda al realizar los sangrados. Por sacarnos de aprietos sobre todo los primeros meses de pandemia, cuando el departamento estaba completamente vacío. Y por brindarme su amistad.

A mis amigos y roomies, Arturo, Fer, Kari y Miguel. Por todos los buenos momentos en y fuera de clases, por todas las risas y aventuras. Por aquellas noches de desvelo en las que había que terminar un trabajo, preparar un artículo o escribir la tesis. Por creer siempre en mí, por recordarme que puedo y, sobre todo por nunca dejarme solo.

A mis padres, Esperanza y Noé. Porque a pesar de la distancia sé que siempre podré contar con ellos. Por su cariño y por su apoyo incondicional.

A mis tías, Mimí, Cris y Oti. Por estar siempre al pendiente de mí.

A Liang Li. Por recordarme que nunca debo de darme por vencido. Por creer en mí y por escucharme siempre.

# Indice

Indice de Figuras.....	I
Indice de tablas .....	III
Abreviaturas .....	IV
Resumen.....	VI
Abstract .....	VIII
Introducción.....	1
Características del virus SARS CoV-2.....	2
Proteínas del SARS CoV-2 .....	3
Proteínas no estructurales .....	8
Proteínas accesorias.....	9
Ciclo de replicación viral .....	9
Respuesta inmune contra el SARS CoV-2.....	11
Desarrollo de Vacunas contra el SARS CoV-2. ....	14
Justificación.....	17
Hipótesis.....	19
Objetivo General. ....	19
Objetivos Específicos. ....	19
Metodología.....	20
Cultivo Celular.....	20
Diseño de plásmidos.....	20
Transformación .....	22
Aislamiento de plásmidos .....	22
Maxi-Prep.....	22
Ensayos de restricción enzimática .....	23
Análisis de Secuencias .....	24
Transfección .....	24
Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes.....	24
Ensayos de Western Blot.....	25
Purificación de las proteínas recombinantes.....	25
Protocolo de Inmunización.....	26

Obtención de Suero .....	27
Determinación de anticuerpos IgM/IgG.....	28
Determinación de anticuerpos neutralizantes (Neutralización simulada) .....	28
Obtención de esplenocitos .....	29
Cultivo y estímulo de esplenocitos .....	29
Ensayo de CBAs .....	30
Inmunofluorescencia de células infectadas con SARS CoV-2 .....	30
Resultados .....	32
Cuantificación del DNA .....	32
Análisis de secuencias de los plásmidos .....	33
Evaluación de la expresión de proteínas recombinantes .....	34
Producción y purificación de las proteínas recombinantes .....	36
Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG en los ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes.....	41
Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en los grupos de ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes.....	44
El suero de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, reconoce al virus SARS CoV-2 en células infectadas .....	47
Respuesta de células T.....	48
Discusión.....	51
Conclusión.....	59
Referencias. ....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura del SARS CoV-2. ....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura de la proteína Spike de SARS CoV-2. ....	4
<b>Figura 3.</b> Conformación Up y Down del dominio RBD.....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura de la proteína de Nucleocápside.....	6
<b>Figura 5.</b> Modificaciones post traduccionales en la proteína N.....	7
<b>Figura 6.</b> Respuesta inmune contra el SARS CoV-2.....	13
<b>Figura 7.</b> Esquema general para el desarrollo de vacunas.. ....	15
<b>Figura 8.</b> Plataformas empleadas para el desarrollo de vacunas.....	16
<b>Figura 9.</b> Esquema de los plásmidos s-N-His, S1-His, s-RBD-His. ....	21
<b>Figura 10.</b> Esquema de inmunización. ....	27
<b>Figura 11.</b> Patrón electroforético de la digestión de plásmidos N, S1 y RBD.. ....	33
<b>Figura 12.</b> Comparación y alineamientos de las secuencias.....	34
<b>Figura 13.</b> Lo sobrenadantes de las células Expi293 transfectadas, expresan las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2.....	35
<b>Figura 14.</b> Los anticuerpos presentes en el suero de individuos recuperados de COVID-19 reconocen las proteínas recombinantes N, S1 y RBD.. ....	36
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de purificación por columna de afinidad.....	37
<b>Figura 16.</b> Análisis de fracciones obtenidas en el proceso de purificación por afinidad. ....	38
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas de purificación por columna de exclusión molecular..	39
<b>Figura 18.</b> Análisis de fracciones obtenidas en el proceso de exclusión molecular. ....	40
<b>Figura 19.</b> Análisis de pureza de las proteínas recombinantes. ....	41
<b>Figura 20.</b> Las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos específicos de clase IgM. ....	42
<b>Figura 21.</b> Las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos específicos de clase IgG.. ....	44
<b>Figura 22.</b> Las proteínas recombinantes S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos neutralizantes.. ....	46

**Figura 23.** Los anticuerpos presentes en los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, reconocen al virus SARS CoV-2 en su forma nativa. .... 49

**Figura 24.** El estímulo con las proteínas recombinantes induce la producción de citocinas en los esplenocitos de los ratones inmunizados.. ..... 50

## Indice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cuantificación del DNA plasmidico para las construcciones pcDNA3.1/N, pcDNA3.1/S1 y pCAGGS/RBD.....	32
<b>Tabla 2.</b> Títulos de anticuerpos neutralizantes en los grupos S1 y S1/N .....	47

## Abreviaturas

ACE2	Receptor de Angiotensina 2
ACF	Adyuvante Completo de Freud
AIF	Adyuvante Incompleto de Freud
CD	Dominio de Conexión
CH	Hélice Central
COVID-19	Coronavirus Disease 19
CTD	Dominio Carboxilo Terminal
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Envoltura
ELISA	Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzima
ERGIC	Compartimento Intermedio del Retículo Endoplásmico
FP	Péptido Fusión
FPLC	Cromatografía Líquida de Proteínas a Alta Velocidad
HR	Regiones Heptadas
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IP	Intraperitoneal
LKR	Región Linker
LPB	Licencia para Producto Biológico
M	Membrana
MDA5	Factor Asociado a la Diferenciación de Melanoma
MERS	Síndrome Respiratorio del Medio Oeste
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
N	Nucleocápside
NFI	Nuevo Fármaco en Investigación
NSP	Proteínas No Estructurales
NTD	Dominio N terminal

OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de Lectura abierto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	Para-Formaldehído
RBD	Dominio de Unión al Receptor
RBM	Dominio Mínimo de Unión al Receptor
RIG	Gen inducible por Ácido Retinoico
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa- Retro transcripción
S	Spike, Espiga, Espícula
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo grave
SAXS	Dispersión de Rayos X por Ángulo Pequeño
SgRNA	RNA sub genómico
SnELISA	Neutralización Simulada por ELISA
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Transmembrana
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UTR	Región no Traducida
WB	Western Blot

## Resumen

La enfermedad COVID-19 es causada por el virus CoV-2 del SARS y ha causado millones de muertes en todo el mundo. El hecho anterior ha provocado que múltiples grupos de investigación centren sus esfuerzos en el desarrollo de vacunas contra este virus. Por lo tanto, es importante evaluar diferentes antígenos vacunales inicialmente en modelos animales. Los reportes sobre SARS-CoV muestran que la proteína Spike (S) y de nucleocápside (N) son los antígenos más inmunogénicos, siendo la proteína S la inductora de una respuesta inmune protectora basada en la inducción de anticuerpos neutralizantes. El objetivo de este trabajo fue expresar y purificar la proteína N, el dominio S1 y el dominio RBD de la proteína Spike del SARS CoV-2 y evaluar su inmunogenicidad individualmente y en combinación en un modelo murino. Para obtener los antígenos, se transfectaron células Expi293 con las construcciones pCDNA3.1 / N, pCDNA3.1 / S1 y pCAGGS / RBD de SARS-CoV-2 (MN908947.3). Transcurridos 7 días, los sobrenadantes se purificaron mediante IMAC y cromatografía de filtración en gel. Posteriormente, se determinó la pureza e identidad de estos. Se utilizaron 5 grupos de ratones BALB/c, cada uno inmunizado con 10 µg de antígeno individualmente o en combinación. Los grupos fueron los siguientes: 1 (N), 2 (S1), 3 (RBD), 4 (N + S1), 5 (N + RBD). Posterior a la inmunización, se realizaron sangrados cada 20 días. En el suero obtenido, se determinaron los niveles de anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas N, S1 y RBD, así como su capacidad neutralizante. Se cultivaron esplenocitos de ratones inmunizados y se estimularon con las proteínas recombinantes N, S1 y RBD para determinar la secreción de citocinas. Se obtuvieron las tres proteínas de interés, con gran pureza y con un alto rendimiento (N 1 mg, S1 1.5 mg, RBD 4 mg). Se detectó la presencia de anticuerpos de clase IgM e IgG en los ratones inmunizados. Los anticuerpos de los ratones inmunizados con RBD, RBD / N, S1 y S1 / N mostraron actividad neutralizante. Los grupos RBD y S1 mostraron un porcentaje de neutralización cercano al 75%, mientras que los grupos RBD/N y S1/N mostraron un porcentaje de neutralización cercano al 90%. Se observó también la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 en los grupos RBD/N y S1/N. Los resultados anteriores

indican que las proteínas del SARS CoV-2 generadas por nuestro grupo de trabajo son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular. Además, la inmunización combinada con proteína N induce niveles más altos de anticuerpos IgG, porcentaje de neutralización y producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2.

## Abstract

The COVID-19 disease is caused by the SARS CoV-2 virus and has caused millions of deaths worldwide. The above fact has caused multiple research groups to focus their efforts on vaccines development against this virus. Therefore, it is important to evaluate different vaccine antigens initially in animal models. Reports in SARS-CoV show that protein S and N are the most immunogenic antigens, with protein S being the inducer of a protective immune response based on the induction of neutralizing antibodies. The objective of this work was to express and to purify the N protein, the S1 domain, and the RBD domain of the Spike protein of SARS CoV-2 and evaluate their immunogenicity individually, and in combination, in a murine model. To obtain antigens, Expi293 cells were transfected with the SARS-CoV-2 (MN908947.3) pCDNA3.1 / N, pcDNA3.1 / S1, and pCAGGS / RBD constructs. After seven days, the supernatants were purified by IMAC and gel filtration chromatography. Subsequently, the purity and identity of these were determined. Five groups of BALB /c mice were used, each one immunized with 10 µg of antigen individually or in combination. The groups were conformed as follows: 1 (N), 2 (S1), 3 (RBD), 4 (N + S1), 5 (N + RBD). After immunization, bleedings were performed every 20 days. Levels of IgM and IgG antibodies against the N, S1, and RBD proteins were determined, as well as their neutralizing capacity, both in sera. Splenocytes of immunized mice were cultured and stimulated with the recombinant proteins N, S1, and RBD to determine cytokine secretion. The three proteins of interest were obtained, with great purity and with a high yield (N 1mg, S1 1.5mg, RBD 4mg). The presence of IgM and IgG class antibodies was detected in the immunized mice. Antibodies of the immunized mice with RBD, RBD / N, S1, and S1 / N showed neutralizing activity. The RBD and S1 groups showed a neutralization percentage close to 75%, while the RBD / N and S1 / N groups showed a neutralization percentage close to 90%. The production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 was observed in the RBD / N and S1 / N groups. The above results indicate that the SARS CoV-2 proteins generated by our working group are capable of inducing a humoral and cellular immune response. Furthermore, immunization combined with protein N

induces higher levels of IgG antibodies, percentage of neutralization and production of the cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2.

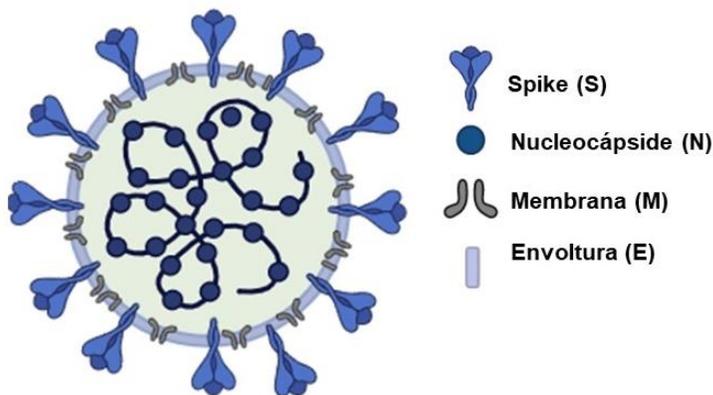
## Introducción.

En diciembre de 2019 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) informó sobre el surgimiento de un brote de neumonía atípica en la ciudad de Wuhan, China. El agente causal fue identificado como un nuevo beta coronavirus. La Organización Mundial de la Salud (OMS) nombró a este virus como SARS CoV-2 y a la enfermedad causada por este virus como COVID-19, por sus siglas en inglés, Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)<sup>1</sup>. Históricamente los beta coronavirus han provocado brotes infecciosos respiratorios de gravedad. Como ejemplo de ellos, el SARS CoV se identificó por primera vez en Guangdong, China, en febrero de 2003. La infección se propagó a 29 países durante el período comprendido entre noviembre de 2002 y julio de 2003. Se reportaron 8096 casos confirmados y 774 muertes, por lo que este virus mostro una tasa de letalidad del 9.6 %<sup>2</sup>. Otro coronavirus de gran importancia es el MERS CoV el cual, se identificó por primera vez en Jeddah, Arabia Saudita en 2012. Este virus se extendió a 21 países, reportando 2494 casos confirmados y 858 defunciones , con una tasa de letalidad del 34.4 %<sup>3</sup>. Este nuevo coronavirus SARS CoV-2 responsable de la pandemia más grave de este siglo de acuerdo a la OMS reportó 184'547,730 casos confirmados hasta el mes de julio de 2021, y 3'993,056 defunciones <sup>4</sup> .

La COVID-19 provoca una enfermedad a nivel del tracto respiratorio, con una sintomatología que incluye tos seca, fiebre, diarrea, pérdida del gusto y pérdida del olfato en algunos individuos. La enfermedad se presenta con diferentes formas clínicas desde las formas asintomática hasta casos graves de COVID 19 que presentan insuficiencia respiratoria, la cual conlleva a la muerte. También se han reportado complicaciones fuera del tracto respiratorio y que afectan órganos como corazón, hígado, riñones y sistema nervioso central<sup>5,6</sup>.

## Características del virus SARS CoV-2.

Los coronavirus pertenecen al orden Nidoviridae y se dividen en 4 géneros: Alfa-coronavirus, Beta-coronavirus, Gamma-coronavirus y Delta-coronavirus. Se han identificado seis coronavirus capaces de infectar a los seres humanos, Coronavirus humano-229E, NL63, HKU1, OC43, SARS CoV y MERS CoV<sup>7</sup>. Estos son virus envueltos con un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo y no segmentados. La partícula viral presenta proyecciones o espículas en su superficie. El genoma del SARS CoV-2 es de RNA mono catenario de sentido positivo con un tamaño de 29891 nucleótidos y que codifica para 9860 aminoácidos. Al igual que otros  $\beta$  coronavirus, el genoma del SARS CoV-2 contiene dos regiones UTR 3' y 5'<sup>8</sup>. Este genoma consta de 10 marcos de lectura abiertos (ORF). En el primer ORF (ORF1a/b) están presentes aproximadamente dos tercios del RNA viral que codifica para la poli proteína 1a, la poli proteína 1b, y también codifica para 16 proteínas no estructurales (nsp). El ORF2 codifica para la proteína S, el ORF4 para la proteína E, el ORF5 para la proteína M y el ORF9 para la proteína N. Los ORFs restantes (3a, 6, 7a, 7b, 8 y 10) codifican para proteínas accesorias<sup>9</sup>.



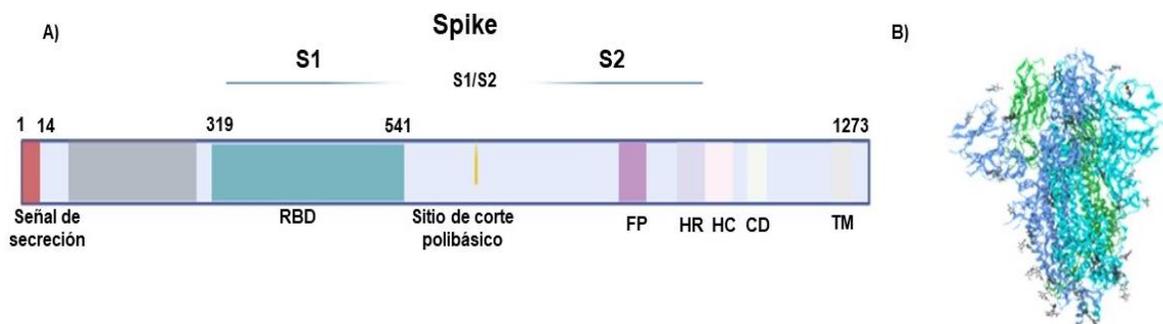
**Figura 1. Estructura del SARS CoV-2.** Representación esquemática de las proteínas estructurales del virus SARS CoV-2. Proteína Spike (S), Proteína de Nucleocápside (N), Proteína de Membrana (M) y proteína de Envoltura (E). *Creado en Biorender.com*

## **Proteínas del SARS CoV-2.**

El SARS CoV-2 es un virus envuelto de un tamaño aproximado entre 50 y 200nm posee cuatro proteínas estructurales; la proteína Spike o de espícula (S), la proteína de nucleocápside (N), la proteína de Envoltura (E) y la proteína de membrana (M) (Figura 1). El virus presenta una envoltura compuesta por una bicapa lipídica en la que se insertan varias proteínas transmembranales como la proteína S, M y E<sup>10</sup>. La proteína S permite el ingreso del virus en la célula blanco, la proteína N forma parte de la nucleocápside y participa en el proceso de replicación viral uniéndose al RNA recién sintetizado. La proteína de envoltura se ensambla como una proteína pentamérica de forma similar a una viroporina. Mientras que la proteína de membrana interactúa con el resto de las proteínas estructurales y es importante en el momento del ensamblaje viral<sup>9</sup>.

### **Proteína Spike.**

La proteína S del SARS CoV-2 tiene una longitud de 1213 aminoácidos y posee un 75 % de homología con la proteína S del SARS CoV. Estructuralmente se encuentra formando un trímero y presenta además múltiples sitios de glicosilaciones. A diferencia de otros coronavirus, posee un sitio de corte polibásico de furina (P681, R682, R683 y A684) el cual da origen a dos subunidades; S1 y S2<sup>11</sup>. Dentro de la subunidad S1 se encuentra el Dominio de Unión a Receptor (RBD), dominio que permite la interacción con el receptor de la enzima convertidora de Angiotensina-2 (ACE2) permitiendo así el ingreso del virus a las células<sup>12</sup>. La subunidad S2 contiene una región de péptido de fusión (FP), dos regiones de repetición en heptadas (HR1, HR2), una hélice central (CH), un dominio de conexión (CD), un dominio transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (Figura 2). Las características de ésta proteína permiten que la membrana del virus se fusione con la membrana de la célula blanco<sup>13,14</sup>.

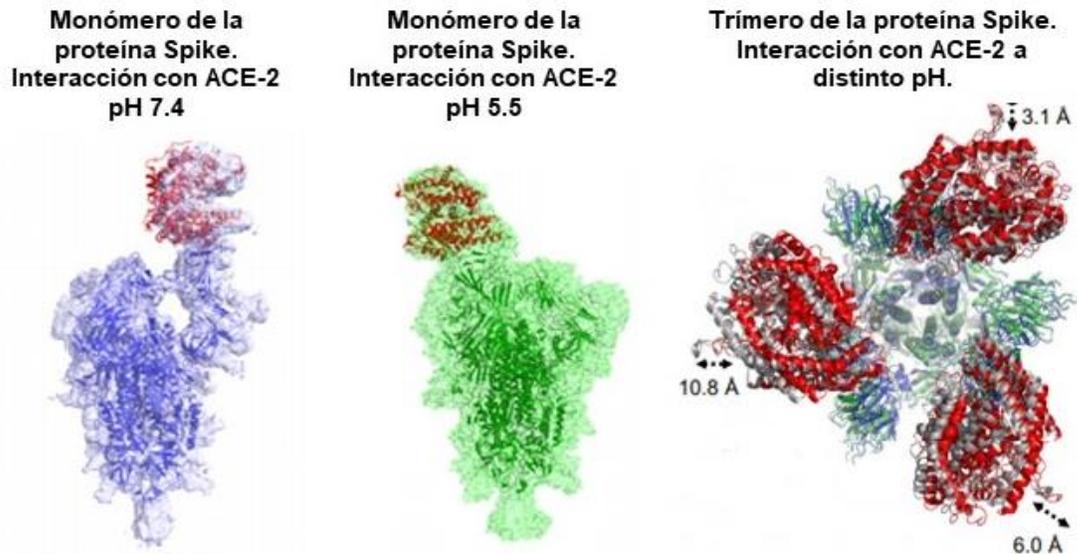


**Figura 2. Estructura de la proteína Spike de SARS CoV-2.** A) Representación esquemática de los dominios presentes en la proteína Spike del virus de SARS CoV-2. Se destacan el sitio de corte polibásico el cual da origen a las subunidades S1 y S2. Dentro de la subunidad S1 se encuentra presente el dominio RBD y una señal de secreción. B) Representación de la estructura por crio-ME de la proteína Spike completa en forma de trímero. ID:6VXX. Creado en Biorender.com

Estructuralmente, el dominio RBD consta de cinco láminas  $\beta$  dispuestas de forma anti paralela y conectadas por bucles y hélices cortas estabilizadas por puentes disulfuro en los residuos de cisteína. Dentro de estas láminas anti paralelas, se encuentra el motivo mínimo de unión al receptor (RBM); este dominio es ligeramente cóncavo y es la secuencia que se une propiamente al receptor ACE2<sup>12</sup>. De acuerdo a diferentes estudios de cristalografía se ha mostrado que RBD puede adoptar dos conformacionales (Figura 3), hacia arriba y hacia abajo ("up" y "down"). Un estudio reciente mostró que la conformación es dependiente del pH, la conformación "up" se favorece por el pH neutro, mientras que un pH ácido, similar al pH de los endosomas, favorece la conformación "down". Se ha observado también que la conformación "Up" es la que permite una mejor interacción de RBD con el receptor ACE2<sup>15</sup>.

Una vez que la región RBD interacciona con ACE2, la proteína Spike adopta una conformación de fusión. Durante este estado la interacción de los dominios HR y CH genera un reordenamiento que da lugar a una hélice de tallo en la dirección de la membrana de la célula blanco. El trímero S2 adopta una estructura muy estable y rígida después de la fusión. Se ha reportado que la proteína S tiene un gran número de N glicosilaciones<sup>16</sup>. Las glicosilaciones presentes en la subunidad S2

podrían estar ocultando épitopos importantes durante el estado de prefusión / post fusión y, por lo tanto, evitar que los anticuerpos reconozcan esta subunidad <sup>17</sup>.

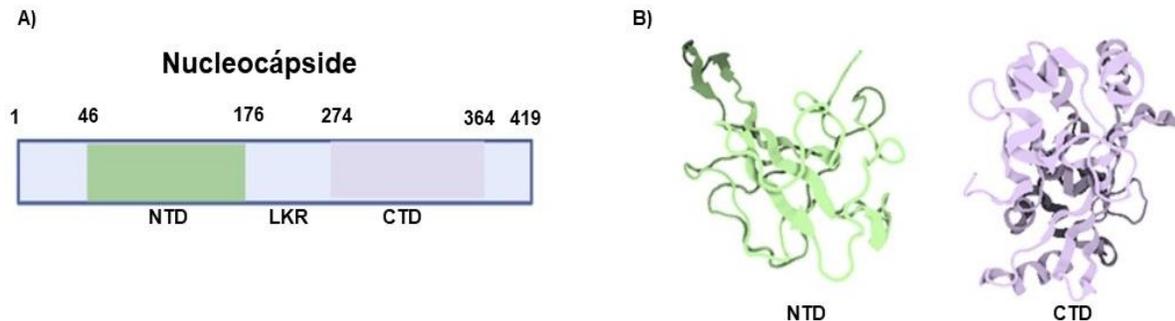


**Figura 3.** Conformación Up y Down del dominio RBD. Representación de la estructura por crió-EM de la conformación del dominio RBD a distinto pH. A) se muestra la interacción de RBD (azul) con el receptor ACE2 (rojo) a pH 7.4 B) Se muestra la interacción de RBD con el receptor ACE2 a pH 5.5 C) Superposición de las interacciones RBD/ACE-2 a pH 7.4 y 5.5. *Imagen adaptada de Zhou, T. et al. Cryo-EM Structures of SARS-CoV-2 Spike without and with ACE2 Reveal a pH-Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. Cell Host and Microbe 28, 867-879.e5 (2020).*

### Proteína de Nucleocápside.

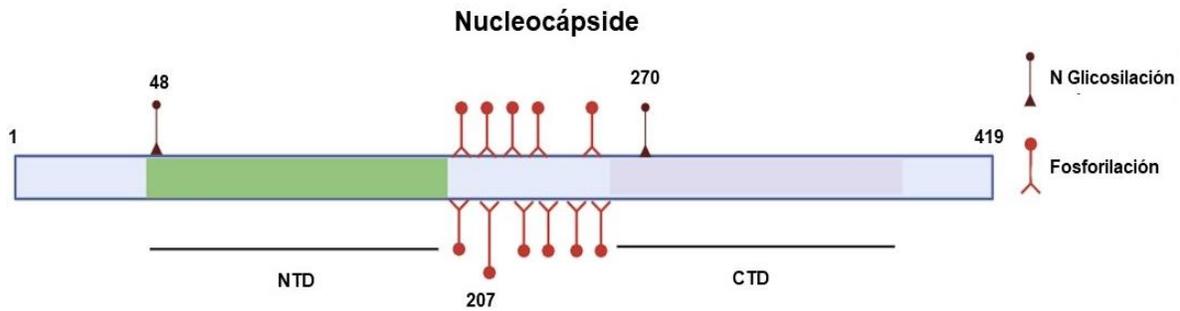
La proteína de nucleocápside del SARS CoV-2 está formada por 419 aminoácidos y presenta una homología del 90.5% con la proteína N del SARS CoV. Posee 2 sitios de unión a RNA, uno en el extremo amino terminal (NTD) y otro en el extremo carboxilo terminal (CTD) (Figura 4). Esta proteína tiene una región con carga positiva a pH neutro, que le facilita la unión con los ácidos nucleicos<sup>18,19</sup>. Entre los dominios NTD y CTD se encuentra una región linker rica en serina y argininas (LKR). Se han realizado estudios de dispersión de rayos X (SAXS) en la proteína N y muestran que esta región es altamente flexible<sup>20</sup>. El dominio NTD está enriquecido con residuos aromáticos y básicos. Estudios estructurales describen este dominio en forma de una mano; los residuos de la cola N-terminal (Asn48, Asn49, Thr50 y

Ala51) son muy flexibles y se extienden hacia afuera formando un pocket que permite una interacción adecuada con el RNA viral<sup>19</sup>.



**Figura 4. Estructura de la proteína de Nucleocápside.** A) Representación esquemática de la proteína N Del virus de SARS CoV-2. Se muestran dos sitios de unión a RNA (NTD y CTD) así como una región linker (LKR). B) Representación de la estructura cristalina de los dominios NTD (verde) y CTD (morado) de la proteína N. ID:7CE0, 7CDZ. Creado en *Biorender.com*

La secuencia de la proteína N se ha analizado detalladamente y se ha encontrado que es susceptible a modificaciones postraduccionales como forforilaciones y N-glicosilaciones. Se han descrito 11 sitios susceptibles de fosforilación en la región LKR. En un estudio desarrollado por Azad y colaboradores, se sugiere que la fosforilación 207 de la región LKR modula la interacción de la proteína N con el RNA<sup>21</sup>. Trabajo previo con otros coronavirus, ha revelado que la fosforilación de la proteína N se presenta durante la replicación y transcripción, una vez que el virion madura, los niveles de fosforilación se ven disminuidos<sup>21,22</sup>. Se han caracterizado experimentalmente 2 sitios de glicosilación en las posiciones 48 y 270 de la proteína N. Se piensa que al igual que en otros virus, estos sitios glicosilados podrían estar ocultando épitopos importantes y a su vez funcionando como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune<sup>23</sup>.(Figura 5 )



**Figura 5 Modificaciones pos traducciónales en la proteína N.** La proteína de nucleocápside del SARS CoV-2 es capaz de ser glicosilada y fosforilada. Se han reportado 2 sitios de glicosilación en los aminoácidos 28 y 270. Los sitios de fosforilación para esta proteína se ubican en la región linker. *Creado en Biorender.com*

### Proteína de Membrana.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de membrana del SARS CoV-2 muestra una similitud del 98.2 % con la proteína M del SARS CoV. Posee una longitud de 260 aminoácidos con un dominio N terminal de longitud corta, así como 3 dominios transmembranales. Tiene un papel importante en el ensamblaje viral ya que interactúa con la proteína N para asociarse al genoma de RNA. Además, se ha demostrado que la proteína M del SARS CoV es capaz de inducir apoptosis<sup>10</sup>.

### Proteína de Envoltura.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de envoltura del SARS-CoV-2 muestra una similitud del 98.2 % con la proteína E del SARS-CoV. La proteína E es una proteína transmembrana que consta de 76-109 aminoácidos y posee un ectodominio N-terminal corto y un endodominio C-terminal. Se ha descrito que esta proteína tiene actividad de viroporina, se encuentra presente en bajas cantidades en el virion, pero juega un papel esencial para su ensamblaje y liberación<sup>10</sup>.

## Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (nsp) tienen diversas funciones, algunas participan en mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Tal es el caso de la nsp1 de SARS CoV-2, la cual se une a la subunidad 40S de los ribosomas, siendo capaz de promover la degradación del mRNA, bloqueando de esta manera la traducción de diferentes proteínas, entre ellas la producción de interferón<sup>24-26</sup>. La nsp2 del SARS CoV tiene la capacidad de unirse a prohibitina 1 y prohibitina 2, moléculas importantes dentro del ciclo celular. Lo anterior provoca un arresto dentro del ciclo celular. Nsp2 de SARS CoV-2 posee un 68.3% de identidad con su homóloga en CoV y se piensa puede tener una función similar<sup>10,27</sup>. La nsp3 posee un dominio de proteasa tipo papaína y es responsable de la escisión de otras proteínas no estructurales<sup>28</sup>. Se observó que nsp4 y nsp6 del SARS CoV forman un complejo que permite la formación de vesículas de doble membrana, y que estas estructuras son importantes para la replicación viral<sup>29</sup>. Estas dos proteínas presentan un 80 y 82 % de identidad respectivamente con sus homologas en SARS CoV<sup>10</sup>. La Nsp5 es la proteasa principal del CoV-2, ya que participa en la escisión de las poliproteínas del ORF1ab y la liberación de las proteínas no estructurales maduras<sup>30</sup>. Las nsp restantes (nsp7-nsp16) participan en la replicación viral. Nsp 7 y nsp8 actúan como cofactores de la nsp12 la cual posee una subunidad catalítica con actividad de RNA polimerasa (RdRp)<sup>31,32</sup>. Nsp9 se une al RNA de cadena sencilla durante la replicación. Nsp10 forma un complejo con nsp14 y nsp16 involucrado en la metilación del RNA viral y la formación del Cap. Nsp14 y nsp16 poseen actividad N7-MTasa y 2'-O-MTasa respectivamente<sup>33,34</sup>. El papel de nsp11 no se conoce hasta el momento. Nsp13 posee actividad de helicasa<sup>35</sup> y nsp15 muestra una actividad de endo ribonucleasa. Estudios recientes en SARS CoV-2 muestran las nsp13, nsp14 y nsp15 de este virus son potentes antagonistas del interferón<sup>35</sup>.

## **Proteínas accesorias.**

Las proteínas accesorias participan en la patogenicidad del virus por lo que se cree, están involucrados en los mecanismos de evasión del sistema inmune. Existen diferencias en los reportes en cuanto al número de estas. En un primer estudio se reportan 9 proteínas accesorias, (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10)<sup>36</sup>. Sin embargo, un estudio más reciente concluye que existen únicamente 5 proteínas accesorias canónicas (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b y ORF8)<sup>37</sup>. Hasta el momento son pocos los reportes respecto a la función de cada una de estas proteínas. La proteína del ORF 3a es capaz de inducir apoptosis de las células a través de la vía extrínseca<sup>38</sup>. La proteína ORF6 ejerce una actividad antagónica con el interferón. Además, es capaz de unirse al complejo Nup98/Rae1, el cual es importante para la importación nuclear<sup>39</sup>. La proteína del ORF7 tiene una similitud estructural con ICAM-1, el cual se une al receptor de integrina de linfocitos T LFA-1. Por lo que se piensa esta proteína podría tener un papel en la interacción con células del sistema inmune<sup>40</sup>. La proteína del ORF8 interviene con el MHC-I, provocando una interrupción en la presentación antigénica y la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>41</sup>.

## **Ciclo de replicación viral.**

Al igual que SARS CoV, el SARS CoV-2 emplea como principal receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para ingresar a las células blanco<sup>42</sup>. Este receptor se encuentra altamente expresado en órganos como intestino delgado, testículos, riñones, corazón, tiroides y pulmones. De forma interesante, SARS CoV-2, presenta mayor tropismo por las células epiteliales de las vías respiratorias; tales como las células epiteliales alveolares, células endoteliales vasculares y los macrófagos en el pulmón, debido a que todas estas expresan un alto nivel del receptor ACE2<sup>43</sup>. También se han reportado receptores alternativos como DC-SIGN, L-SIGN, CD147 y AXL<sup>44,45</sup>. Una vez que la proteína S interactúa con el receptor ACE2, la proteasa TMPRSS2 de la célula huésped realiza un corte en el

sitio polibásico de la subunidad S2, exponiendo así un dominio de prefusión. Este dominio contiene varios aminoácidos hidrofóbicos que permiten la fusión de las membranas viral y celular<sup>42</sup>.

Una vez que las partículas virales llegan a los endosomas, la cathepsina L escinde a la proteína S y permite la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma provocando la liberación del genoma viral en el citoplasma celular. El RNA viral es traducido inmediatamente para producir las poli-proteínas pp1a y pp1ab, estas son escindidas por la proteasa viral nsp3, dando origen así a 16 proteínas no estructurales<sup>46</sup>. Las proteínas no estructurales son importantes para la formación del complejo de replicación viral. Posterior a esto, se generan plantillas de RNA subgenómico (sgRNA) que se transcriben en los mRNA y que darán origen a las proteínas estructurales y accesorias, estas permanecen en la membrana del retículo endoplásmico. Los RNA subgenómicos están marcados en el extremo 5' por una secuencia líder común, fusionados a diferentes segmentos del extremo 3' del genoma viral, y tienen una estructura 5'cap una cola de poli adeninas<sup>47,48</sup>. La síntesis de la cadena negativa se da por un proceso de transcripción discontinua. Las proteínas S, M y E se ubican en el retículo endoplásmico mientras que la proteína N recluta a los genomas de RNA recién sintetizados. Estos complejos de ribonucleoproteína resultantes se asocian en las membranas del retículo endoplásmico y posteriormente en el compartimento intermedio del aparato de Golgi (ERGIC) se insertan las proteínas S, M y E. Las partículas virales formadas posteriormente son transportadas a la superficie de la célula, por un mecanismo mediado por exosomas donde se fusionan con la membrana plasmática y provocan la liberación de nuevas partículas virales al espacio extracelular<sup>49,50</sup>.

## **Respuesta inmune contra el SARS CoV-2.**

### **Generalidades de la respuesta inmune.**

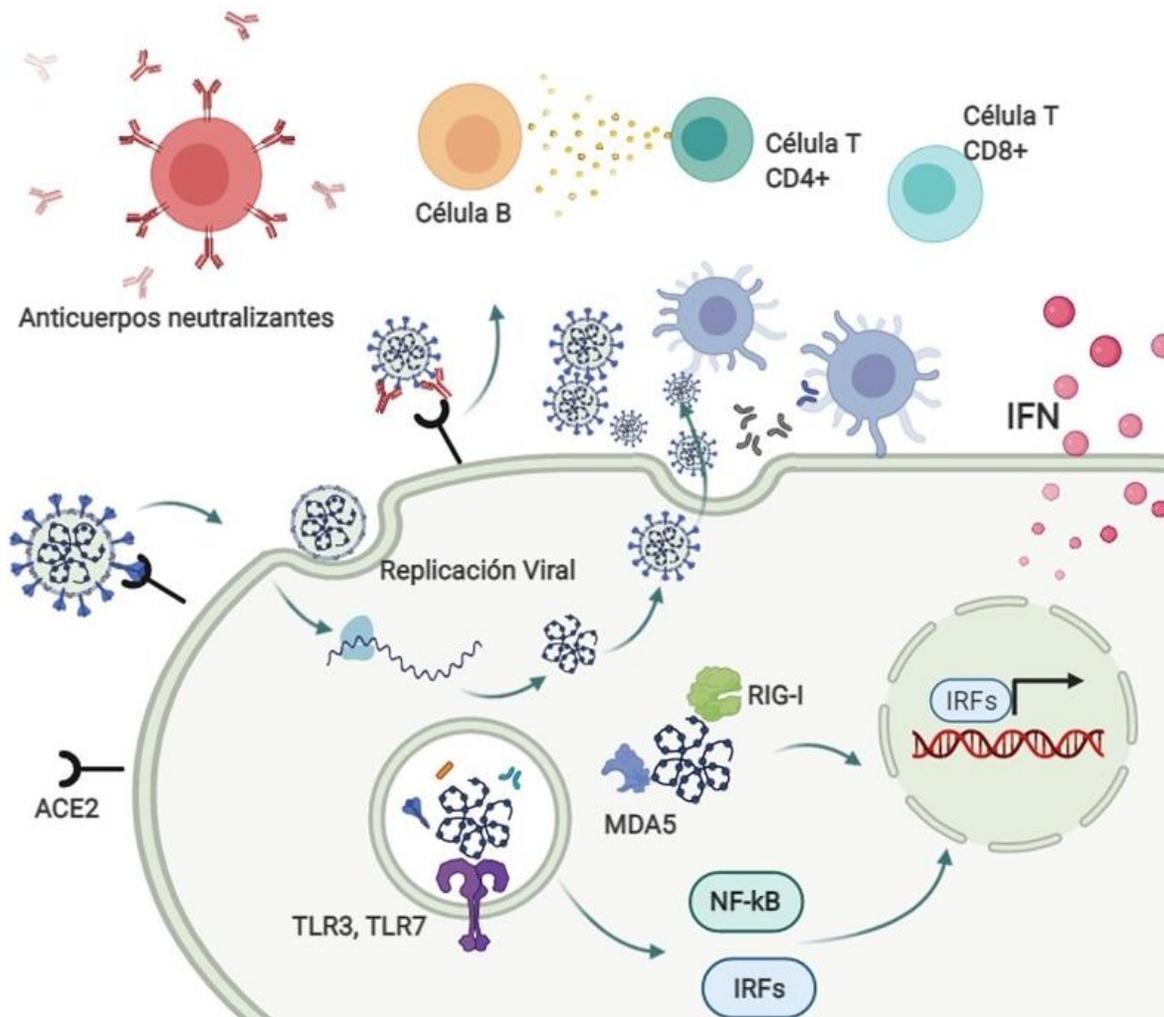
Al igual que con otros virus, la respuesta inmune contra SARS CoV-2 involucra componentes de la inmunidad celular como humoral. Se ha descrito que de forma inicial la infección por SARS CoV-2 ocurre en las células de las vías respiratorias, como son los neumocitos, las células epiteliales alveolares, células endoteliales vasculares y los macrófagos de pulmón. En algún punto de la replicación dentro de estas células, el RNA viral queda expuesto y puede ser reconocido por receptores como TLR3, TLR9, RIG-1 y MDA5<sup>51,52</sup>. El reconocimiento anterior induce la activación de diferentes vías de señalización que concluyen en la generación de un estado antiviral caracterizado por la presencia de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL6 e IL-1 $\beta$ <sup>53</sup>. Proteínas como la N, S, M, así como algunas del ORF, son procesadas en el proteosoma para ser presentadas a los linfocitos TCD8+ en el contexto del MHC-I. Células presentadoras de antígeno, como las dendríticas captan los antígenos virales, posteriormente viajan a los centros germinales de los ganglios linfáticos, donde son capaces de activar a los linfocitos T y B naive. Una vez activadas las células B, éstas se diferenciarán a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Algunos estudios reportan que los anticuerpos producidos contra SARS CoV2 están dirigidos de forma predominante a la proteína Spike su dominio RBD y a la proteína de nucleocápside<sup>54,55</sup>. (Figura 6)

La infección viral y la replicación en las células epiteliales de las vías respiratorias provocan una destrucción celular masiva, liberando a su vez DAMPs (Patrones Moleculares asociados a Daño) como ATP y ácidos nucleicos. Estas señales de daño son reconocidas por las células epiteliales vecinas, células endoteliales y macrófagos alveolares, proceso que induce la generación de citocinas y quimiocinas como IL-6, CXCL10, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MCP e INF $\gamma$ <sup>56</sup>. La mayoría de los individuos tienen la capacidad de controlar la infección a través de su sistema inmune y recuperar el estado homeostático, así como disminuir el proceso de

inflamación disminuye la inflamación. Sin embargo, en algunos pacientes, se produce una tormenta de citocinas que conlleva a una inflamación pulmonar generalizada. Los reportes de pacientes con COVID-19 grave muestran altos niveles plasmáticos de IL-2, IL-7, IL-10, CXCL10, MCP1, MIP1 $\alpha$  y TNF<sup>57</sup>. El infiltrado provoca daño en el tejido pulmonar debido a la secreción excesiva de proteasas, así como especies reactivas de oxígeno, hay presencia de daño alveolar difuso, descamación de células alveolares, formación de membrana hialina y edema pulmonar<sup>58</sup>.

### **Respuesta inmune humoral y celular en individuos con COVID-19.**

Actualmente, se tiene un panorama general de la respuesta inmune tanto humoral como celular, y la importancia de ambas en la resolución de la infección viral, gracias a diversos estudios que se han llevado a cabo en individuos que han cursado COVID-19. Los sueros de estos pacientes mostraron la presencia de anticuerpos IgM a partir del día 7 después del inicio de los síntomas, y entre los días 11-12 posteriores al inicio de los síntomas la aparición de anticuerpos de clase IgG contra la proteína S del SARS CoV-2 <sup>59</sup>. De manera muy importante, el análisis de los individuos que cursan con SARS-CoV mostró la persistencia de anticuerpos IgG con actividad neutralizante 3 años posteriores a la infección<sup>60 61</sup>. La mayoría de los estudios evaluaron la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína S o contra el dominio RBD de este virus, sin embargo, se ha descrito que los anticuerpos contra la proteína N pueden ser detectados días antes que los anticuerpos específicos contra S o RBD<sup>61</sup>. Lo anterior se observa claramente en individuos diagnosticados con RT-PCR+ y con síntomas que van desde moderados a severos, sin embargo, existen individuos con RT-PCR+ asintomáticos y que son capaces de transmitir el virus de manera eficiente. Este grupo de individuos presenta bajas o nulas concentraciones de anticuerpos en circulación contra la proteína Spike, por lo que se hipotetiza que la respuesta inmune predominante de ellos está basada en la actividad de las células T<sup>62</sup>.



**Figura 6. Respuesta inmune contra el SARS CoV-2.** Una vez que el virus SARS CoV-2 ingresa a la célula, componentes de estos pueden ser reconocidos por receptores intracelulares como los TLRs, RIG-1 y MDA5, este reconocimiento lleva a la activación de vías de señalización importantes para la generación de un estado antiviral. Componentes virales del espacio extracelular pueden ser captados por células dendríticas y estas activar a las células T CD4+. La cooperación CD4 con las células B, permite la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. *Creado en Biorender.com*

El grupo de Gallais y colaboradores en 2020 analizaron a los familiares de individuos diagnosticados con COVID-19, RT-PCR e IgG positivas. Los familiares de estos individuos tenían la particularidad de tener una RT-PCR negativa para SARS CoV-2 así como no presentar anticuerpos IgG. Sin embargo, al analizar sus células T de sangre periférica detectaron que éstas fueron capaces de responder a las proteínas S y N de este coronavirus<sup>63</sup>. Este dato sugiere que estos individuos llegaron a tener

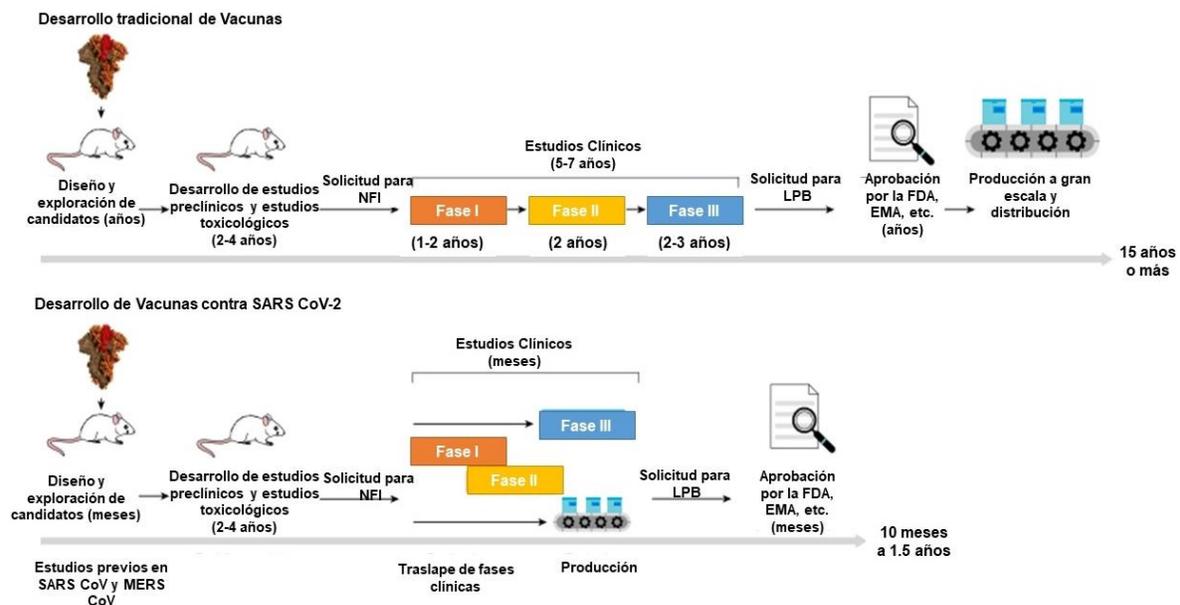
contacto con el virus SARS CoV-2. Sin embargo, al no desarrollar una enfermedad, se propone que la infección viral fue resuelta de manera temprana por las células T. Lo anterior podría explicar por qué en estos individuos no se detectaron anticuerpos IgG contra las proteínas S y N del SARS CoV-2. Thieme y colaboradores en 2020 realizaron un estudio donde analizan la respuesta de las células T de pacientes con COVID moderado, severo y crítico<sup>64</sup>. Este estudio reveló que en la mayoría de los pacientes con COVID-19 crítico las células T CD4+ y CD8+ mostraron una respuesta a las proteínas S, M y N del SARS CoV-2. Adicional a esto, Grifoni y colaboradores aislaron y analizaron linfocitos T de individuos recuperados de COVID-19<sup>65</sup>. Tras estimular a estos con péptidos de SARS CoV-2, detectaron la presencia de clonas de células CD4+ específicas para las proteínas S, M, N y algunas nsp corroborando los datos anteriores. También encontraron clonas de células CD8+ específicas para la proteína N. De manera muy interesante y alentadora, se han encontrado células T de memoria capaces de responder a las proteínas S, N y M en individuos recuperados de SARS CoV, que persisten hasta 11 años después de la infección primaria<sup>66</sup>.

## **Desarrollo de Vacunas contra el SARS CoV-2.**

La aparición de SARS CoV-2 y su impacto en la salud mundial han promovido el desarrollo de vacunas eficaces y seguras que puedan erradicar la COVID 19. De forma convencional, el desarrollo de una vacuna puede llevar hasta 15 años. Sin embargo, todo los conocimientos generados en el desarrollo de vacunas contra otros coronavirus permitieron agilizar en el desarrollo de vacunas contra el SARS CoV-2<sup>67</sup>. (Figura 7).

Después de la epidemia de SARS en 2003, diversos laboratorios comenzaron a desarrollar vacunas que emplearon a la glicoproteína S como antígeno vacunal. A este respecto, Ling y colaboradores desarrollaron una vacuna basada en el virus SARS-CoV inactivado con  $\beta$ -propiolactona, los estudios de este grupo progresaron hasta fase I en ensayos clínicos<sup>68</sup>. También se han desarrollado varias vacunas

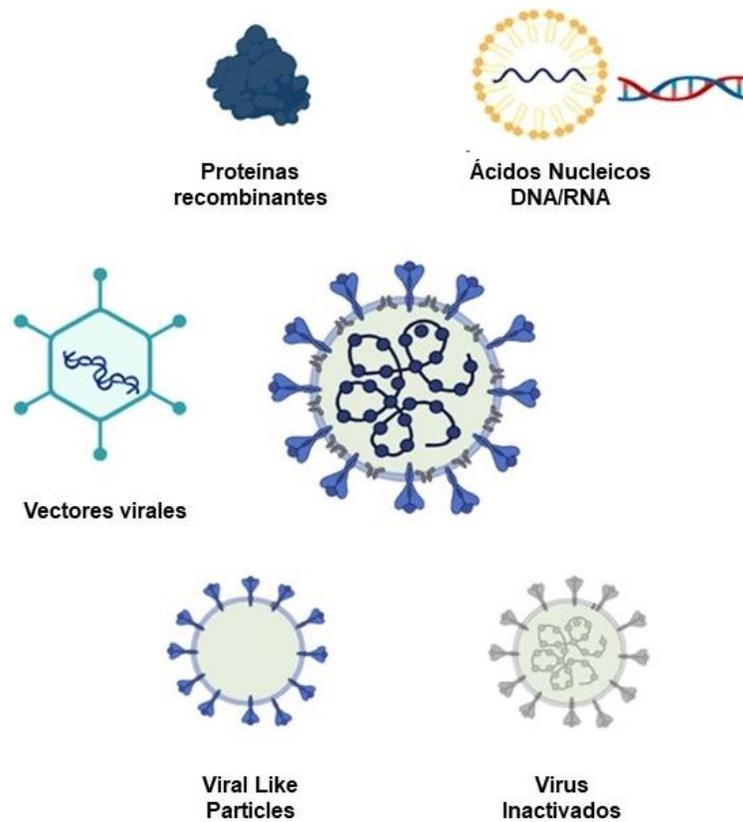
para el coronavirus MERS desde su aparición en 2012, basadas también en la glicoproteína S. La vacuna de DNA, GLS-5300 desarrollada por Modjarrad y colaboradores, quienes expresaron al antígeno S de MERS y ha sido la única que ha llegado a estudios clínicos de Fase I <sup>69</sup>. En los últimos meses, numerosas instituciones públicas y principalmente privadas han abordado el reto de obtener una vacuna contra SARS CoV-2 implementando estrategias similares en SARS-CoV y MERS<sup>67</sup>.



**Figura 7. Esquema general para el desarrollo de vacunas.** Comparativo del desarrollo tradicional de vacunas, con respecto al desarrollo de vacunas contra el SARS CoV-2. *Imagen adaptada de Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. Nature 2020 586:7830 586, 516–527 (2020).*

De acuerdo a la OMS, hasta el momento más de 180 candidatos vacunales contra el SARS CoV-2 se encuentran en desarrollo. Estos candidatos se basan en distintas plataformas, algunas emplean virus atenuados o inactivados, proteínas recombinantes, vectores virales, partículas tipo virales o ácidos nucleicos como DNA y RNA<sup>70</sup> (Figura 8). Debido a los estudios en SARS y MERS y a todos los datos acumulados durante este año de la pandemia, un porcentaje mayor al 90 % de los desarrollos vacunales emplean a la proteína Spike como antígeno vacunal. Hasta

el mes de 2021 a nivel mundial se cuentan ya con 10 vacunas autorizadas para uso de emergencia, 8 vacunas aprobadas<sup>71</sup> y 184 vacunas en fases preclínicas<sup>70</sup>. Del dato anterior, el 36 % corresponde a vacunas basadas en subunidades proteicas. Los estudios preclínicos son un punto fundamental en el desarrollo de cualquier vacuna<sup>70,72</sup>.



**Figura 8. Plataformas empleadas para el desarrollo de vacunas.** Estrategias empleadas para el desarrollo de Candidatos vacunales contra el SARS CoV-2. Vacunas basadas en virus inactivados, partículas tipo virales, vectores virales, proteínas recombinantes y ácidos nucleicos se encuentran en desarrollo. *Creado en Biorender.com*

## Justificación.

Estudios en coronavirus como SARS CoV y MERS, además de todo el conocimiento generado a lo largo de un año con SARS CoV-2 han evidenciado la capacidad inmunogénica de las proteínas estructurales S y N. Se tiene bien establecido que los candidatos vacunales que emplean a la proteína S como antígeno<sup>67</sup>, inducen una respuesta inmune protectora mediada por anticuerpos neutralizantes.

Las evidencias de candidatos vacunales para los coronavirus antes mencionados, han permitido un rápido desarrollo de vacunas contra el SARS CoV-2, las cuales en su mayoría emplean a la proteína S como antígeno<sup>67</sup>. Sin embargo, es claro que deben existir otros antígenos que también participen en la inducción de una respuesta inmune protectora, tal es el caso de la proteína N, que se ha demostrado es capaz de inducir una respuesta inmune protectora mediada por células T<sup>73</sup>.

Hasta la fecha se han reportado una gran cantidad de mutaciones en la proteína S del SARS CoV2, lo que ha generado diversas variantes para este virus. Existen reportes que demuestran que los anticuerpos presentes en individuos vacunados, poseen una capacidad neutralizante menor para las variantes reportadas del SARS CoV-2<sup>74</sup>. Sin embargo, el análisis comparativo de las secuencias de diferentes aislados de SARS CoV-2 no muestran variaciones en la secuencia codificante para la proteína N. Lo anterior sugiere que el uso de esta proteína como candidato vacunal, podría inducir una respuesta inmune contra las variantes que actualmente circulan en el mundo. Un estudio preclínico de un candidato vacunal que emplea a la proteína N como antígeno, reporta que los animales inmunizados con esta proteína son capaces de establecer una respuesta inmune contra variantes del SARS CoV-2. Este estudio indica además que la respuesta inmune es de naturaleza celular e independiente de anticuerpos neutralizantes<sup>75</sup>. Hasta el momento se desconoce si la proteína N induce anticuerpos neutralizantes, sin embargo, se sabe es capaz de inducir una respuesta de células T de memoria<sup>66</sup>. Por otra parte, se ha observado respuesta de células T de memoria contra la proteína N SARS CoV

después de 11 años posteriores a una primo-infección<sup>66</sup>. De manera interesante, y contrastante la inmunidad humoral para este mismo coronavirus se ha detectado solo 3 años después de la primera infección<sup>60</sup>. Estos datos sugieren que la inmunidad celular persiste por más tiempo y, por lo tanto, es importante considerar un candidato vacunal que induzca ambos brazos efectores del sistema inmune, tanto celular como humoral.

Recientemente, algunos grupos de investigación proponen el empleo de otros antígenos de este virus para la generación de nuevos candidatos vacunales. Dentro de estos posibles nuevos antígenos se encuentra el uso de la proteína N. Hasta el momento, son pocos los trabajos que proponen la combinación de más de un antígeno para la inducción de una respuesta inmune más robusta<sup>76-78</sup>.

## **Hipótesis.**

La inmunización combinada de las proteínas recombinantes S1/N o RBD/N inducirá una respuesta inmune más robusta en comparación a una inmunización individual de antígenos.

## **Objetivo General.**

Evaluar la combinación de las proteínas RBD/N y S1/N del SARS CoV-2 en la inducción y magnitud de la respuesta inmune en un modelo preclínico.

## **Objetivos Específicos.**

- 1.- Diseñar y caracterizar los plásmidos recombinantes que codifiquen para las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2.
- 2.- Evaluar la expresión de las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 en la línea celular Expi293.
- 3.- Realizar la purificación de las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2.
- 4.- Realizar esquemas de inmunización en ratones BALB/c con las proteínas recombinantes N, S1 y RBD de forma individual o en combinación, y analizar la respuesta inmune inducida por estas.
  - a) Analizar los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG.
  - b) Determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos.
  - c) Determinar las citocinas inducidas por las proteínas recombinantes.

## **Metodología.**

### **Cultivo Celular.**

Las células Expi293F se crecieron a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/ml en medio Expi293 TM (Gibco, ThermoFisher USA) a 37 °C, al 8 % de CO<sub>2</sub> y en agitación constante a 125 rpm.

Las células Vero se cultivaron en botellas T-75 con medio RPMI suplementado con 5 % de suero fetal bovino, 1 % antibiótico/antimicótico, 1 % vitaminas, 1 % glutamina, 1 % de aminoácidos y 1 % de piruvato. A 37 °C y una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Diseño de plásmidos**

#### **pCAGGS/RBD**

Para la expresión de la proteína RBD se empleó una construcción donada generosamente por el grupo del Dr. Florian Krammer y colaboradores<sup>79</sup>. Esta construcción contiene la secuencia codificante para los aminoácidos 319-541 del dominio RBD de SARS-CoV-2 (GenBank: MN908947.3). En el extremo 5´ contiene los primeros 14 aminoácidos de la proteína S de este mismo virus y que corresponden a una señal de secreción. En el extremo 3´ se adicionó una secuencia codificante para una bandera de 6 histidinas. Toda la secuencia fue optimizada y clonada en el vector de expresión eucarionte pCAGGS (GeneWiz).

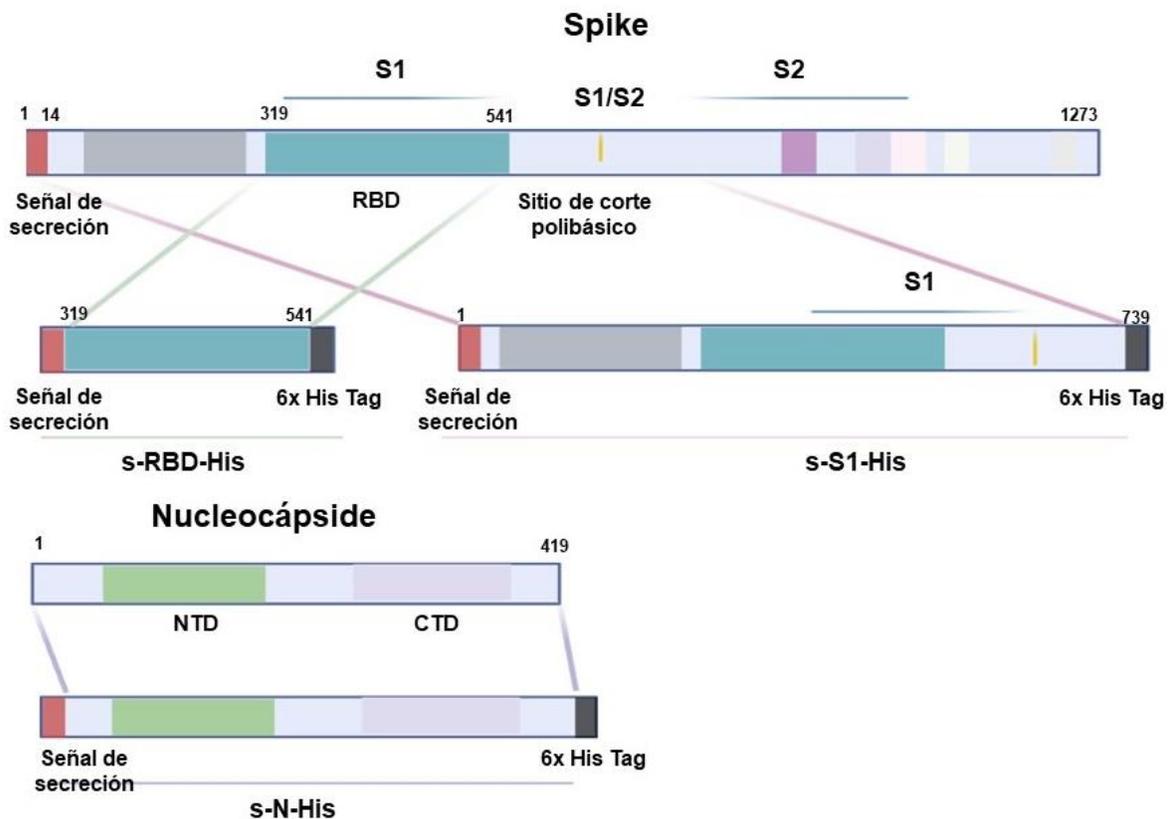
#### **pcDNA3.1/S1**

El diseño de la construcción pcDNA3.1/S1 incluye la secuencia codificante para el dominio S1 (nucleótidos 21563-23738) correspondiente a los primeros 739 aminoácidos de la proteína Spike de SARS CoV-2 (GenBank: MN908947.3). En el extremo 3´se adicionó como bandera una secuencia codificante para 6 histidinas. La secuencia fue optimizada para su expresión en células eucariontes por la

empresa Gen Script y clonada en el vector de expresión eucariote pcDNA3.1 entre los sitios de restricción para las enzimas KpnI y XhoI.

### pcDNA3.1/N

El diseño de la construcción pcDNA3.1/N incluye la secuencia codificante para la proteína completa de Nucleocápside (nucleótidos 28274-29533) del SARS CoV-2 (GenBank: MN908947.3). En el extremo 5' se adicionó la secuencia codificante para los primeros 14 aminoácidos de la proteína Spike del SARS CoV-2 (nucleótidos 21563-21605) y que corresponden a una señal de secreción. En el extremo 3' se adicionó como bandera una secuencia codificante para 6 histidinas. La secuencia fue optimizada para su expresión en células eucariontes por la empresa Gen Script y clonada en el vector de expresión eucariote pcDNA3.1 entre los sitios de restricción para las enzimas KpnI y Apal.



**Figura 9 Esquema de los plásmidos s-N-His, S1-His, s-RBD-His.** Esquema representativo del diseño de los plásmidos codificantes para las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2. Los recuadros rojos esquematizan la secuencia la señal de secreción, en los recuadros de color gris, un Tag de 6 histidinas. *Creado en Biorender.com*

## **Transformación.**

Las bacterias XL10Gold se transformaron con 10 ng de plásmido y se incubaron 20 minutos en frío. Transcurrido este tiempo se dio un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, seguido de 1 minuto en hielo. Se adicionaron 250 µL de medio LB sin antibiótico y se incubó 1 h en agitación a 37 °C. Posteriormente la mezcla se pasó a placas de LB Agar con Ampicilina. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

## **Aislamiento de plásmidos**

El análisis de la presencia del inserto en los plásmidos se llevó a cabo mediante la preparación de Minipreps, para ello se seleccionaron al azar colonias que crecieron en presencia de ampicilina. Se tomó una azada de estas y se inocularon en 5ml de medio LB más antibiótico. Estas mismas colonias se resembraron en una placa de agar LB más ampicilina. Las bacterias de los cultivos líquidos se empastillaron a 13000 rpm durante 15 minutos. Se adicionaron 300 µL de buffer TENS al pellet obtenido y posteriormente 150 µL de buffer de Acetato de sodio 3M pH 5.2, se homogenizó mediante vortéx y se procedió a centrifugar a 13000rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 900 µL de EtOH absoluto frío a cada tubo, estos se almacenaron a -70 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con EtOH al 70 %. El pellet obtenido se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente, este se resuspendió en 25 µL de H<sub>2</sub>O estéril.

El DNA plasmidico se analizó mediante un proceso de electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

## **Maxi-Prep**

Con base en el gel del DNA obtenido por Miniprep se seleccionó una colonia para cada uno de las construcciones. Se tomó una azada de la colonia seleccionada y con esta se realizó un subcultivo en 10 ml de medio LB más ampicilina. Este se

incubó toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente se tomaron 500 µL de este subcultivo y se inocularon en 500ml de medio LB más ampicilina, el cultivo se realizó toda la noche a 37 °C y en agitación a 180 rpm.

La obtención de DNA plasmidíco se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit Plasmid Maxi Kit (QIAGEN). Los cultivos bacterianos se centrifugaron 20 min a 600 rpm para obtener el pellet de bacterias. Posteriormente se adicionaron 10 ml de buffer P-1, 10 ml de buffer P-2 y finalmente 10 ml de buffer P-3- La mezcla se incubó 20 minutos en frío. Se procedió a centrifugar a 20000 xg por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se hizo pasar en una columna previamente equilibrada con 10 ml de buffer QBT. Posteriormente se realizaron 2 lavados con 30ml de buffer QC y el DNA se eluyó con 15 ml de buffer QF. Se adicionaron 10.5 ml de Isopropanol y se centrifugó a 20000 xg por 30 minutos a 4 °C. El botón obtenido se lavó 2 veces con 1 ml de EtOH al 70 %, finalmente este se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 250 µL de agua estéril. El DNA obtenido se cuantificó mediante el equipo Nanodrop.

## **Ensayos de restricción enzimática.**

El DNA obtenido por MaxiPrep se ajustó a una concentración de 1 µg/µL con agua estéril. Se empleó 1 µg de DNA para digerir con las enzimas de restricción correspondientes. La mezcla de reacción fue la siguiente. S1: 1 µL de DNA, 1 µL de enzima KpnI, 1 µL de enzima XhoI, 2 µL de buffer CutSmart™ y 15 µL de H<sub>2</sub>O estéril. N, 1 µL de DNA, 1 µL de enzima KpnI, 1 µL de enzima ApaI, 2 µL de buffer CutSmart™ y 15 µL de H<sub>2</sub>O estéril. RBD, 1 µL de DNA, 1 µL de enzima XhoI, 1 µL de enzima HindIII, 2 µL de buffer CutSmart™ y 15 µL de H<sub>2</sub>O estéril.

Las mezclas de reacción para RBD y S1 se incubaron toda la noche a 37 °C. La mezcla para N se incubó una hora a 27 °C y posteriormente toda la noche a 37 °C. Las muestras digeridas y no digeridas se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

## **Análisis de Secuencias.**

Las muestras de DNA plasmidico se enviaron a secuenciar con la empresa Macrogen Corea. Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron en las plataformas Clustal Omega y Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

## **Transfección**

El proceso de transfección se realizó empleando el kit Transient Protein Expression System™ (GIBCO, ThermoFisher USA). Una vez que el cultivo de células Expi293 se ajustó a una densidad celular de  $3 \times 10^6$  células/ml, se preparó la mezcla de transfección. En un primer tubo se diluyó el DNA plasmidico (RBD, S1 o N) a razón de 1 µg de DNA por ml de cultivo en 3 ml de medio Opti-MEM™ (Gibco, ThermoFisher USA). En un segundo tubo se diluyeron 160 µL de Expifectamina™ 293 (Gibco, ThermoFisher USA) en 3 ml de medio Opti-MEM™. Se realizó la mezcla y esta se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, la mezcla se adicionó al cultivo celular. 24 h post transfección se adicionaron 300 µL de Transfection Enhancer-1™ y 3 ml de Transfection Enhancer-2™.

## **Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes**

Al día 5 y 7 post-transfección se tomaron alícuotas de los cultivos celulares y se analizaron mediante geles de poliacrilamida. Para los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados con RBD y N, se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS, mientras que para los sobrenadantes de los cultivos transfectados con S1 los geles empleados fueron al 8 %.

Algunos de los geles se tiñeron durante 30 minutos con Azul Coomassie y posteriormente fueron tratados con solución desteñidora (ácido acético, metanol). Estos se documentaron empleando el equipo ChemiDoc MP Imagen System (Bio-Rad). Otros geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas

a 120 V. Posteriormente las membranas se bloquearon empleando una solución al 5% de caseína (Leche semidescremada) /PBS-Tween 0.1 %, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionó el anticuerpo anti Histidina-HRP (Invitrogen) en dilución 1:500 (PBS-Tween/ Leche 5 %) durante toda la noche. Se realizaron lavados con PBS-Tween 0.1 % Se adicionó el reactivo y las membranas fueron observadas también en el equipo ChemiDoc MP Imagen System (Bio-Rad).

### **Ensayos de Western Blot.**

Los sobrenadantes se recolectaron al día 7 postransfección y fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente estos se concentraron a un volumen final de 5 ml, en tubos centríficos con corte de 50 kDa para RBD y N, y corte de 100 kDa para S1. Los sobrenadantes concentrados se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15 % para RBD y N, y al 8 % para S1. Estos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 2 horas a 120 V. Posteriormente las membranas se bloquearon empleando una solución al 5 % de caseína (leche semidescremada) /PBS-Tween 0.1 %, durante 2 horas. Como anticuerpo primario se emplearon sueros de individuos convalecientes a COVID-19, en una dilución 1:500 (PBS-Tween/ Leche 5 %) durante toda la noche. Se realizaron lavados con PBS-Tween 0.1 % y se adicionó como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo goat-anti human-HRP (Invitrogen) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizaron lavados con PBS-Tween 0.1 % y finalmente se adicionó el reactivo. Las membranas fueron observadas empleando el equipo ChemiDoc MP Imagen System (Bio-Rad).

### **Purificación de las proteínas recombinantes.**

Los sobrenadantes se recolectaron al día 7 post transfección y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente estos se concentraron a un volumen final de 5 ml, en tubos centríficos con corte de 50 kDa para RBD y N, y corte de 100 kDa para S1. Posteriormente, se llevaron a un volumen final de 50 ml con Buffer A (25

mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol). La purificación se realizó mediante FPLC empleando el equipo AKTA-Pure 25M. Para ello se utilizó una columna HisTrap HP 5 ml (Cytiva) la cual se equilibró con 10 volúmenes de Buffer "A". Enseguida se realizó la inyección del sobrenadante del cultivo (proteína), y a continuación la columna fue lavada con 10 volúmenes de buffer "A" para eliminar contaminantes. Posteriormente se realizó la elución con Buffer "B" mediante un gradiente de concentración (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol). El pH de los buffers "A" y "B" fue diferente para cada proteína; RBD pH= 7.4 S1 pH= 6.4, N pH= 9. Finalmente, las fracciones obtenidas se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS teñidos con azul Coomassie.

Las fracciones que contenían la proteína de interés, se concentraron a 1 ml en tubos centrífuga del corte descrito anteriormente. Estas se sometieron a purificación por FPLC utilizando una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (RBD y N) o Superdex200 increase 10/300 GL (S1) (Cytiva). De forma inicial, la columna se equilibró con 10 volúmenes de PBS, enseguida se hizo la inyección de la proteína y el proceso de elución se realizó empleando PBS. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS teñidos con azul Coomassie. Aquellas fracciones enriquecidas con las proteínas purificadas se cuantificaron mediante el kit de Bradford (Biorad) y se analizaron nuevamente en un gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie para determinar la pureza de estas.

## **Protocolo de Inmunización.**

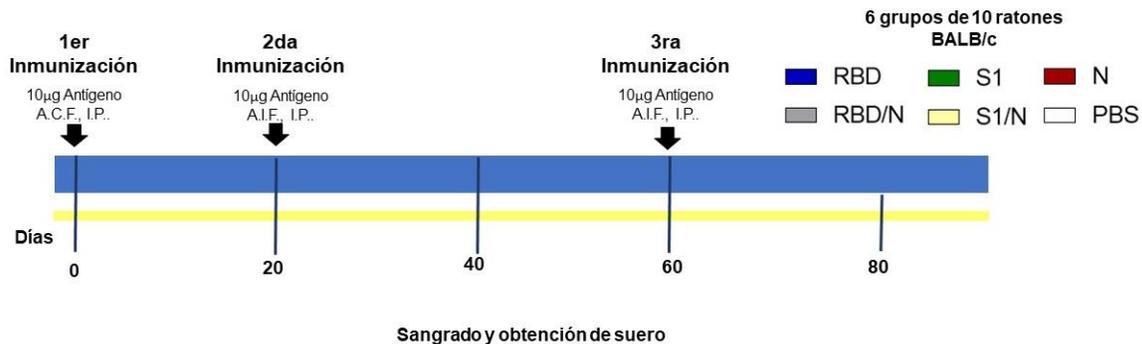
Se emplearon 6 grupos de 10 ratones BALB/c, hembras de 5-6 semanas. Los grupos empleados fueron los siguientes.

Grupo 1: Inmunización con N

Grupo 2: Inmunización con S1

- Grupo 3: Inmunización con RBS
- Grupo 4: Inmunización con RBD+ N
- Grupo 5: Inmunización con S1 + N
- Grupo Control: Inmunización PBS (

Se administraron 3 dosis con 10 µg de antígeno vía intraperitoneal cada una. En la primera inmunización los antígenos se mezclaron con 50 µL de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). En la segunda y tercera inmunización el antígeno se diluyó en 50 µL de PBS más 50 µL de Adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich). El grupo control se inmunizó únicamente con PBS más los adyuvantes antes mencionados.



**Figura 10. Esquema de inmunización.** Se emplearon 6 grupos de 10 ratones BALB/c los cuales se inmunizaron de forma individual o en combinación con las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2. Se tomaron muestras de sangre en el día 0 y a intervalos de 20 días previo a cada inmunización. *Creado en Biorender.com*

## Obtención de Suero

Los ratones para experimentación fueron sangrados de acuerdo a los lineamientos éticos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo el protocolo 02-11-16. Previo al sangrado los ratones se anestesiaron con ketamina/xilacina. Se obtuvo sangre de la vena caudal de cada uno de los ratones en tubos Eppendorf. La sangre obtenida se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos para poder separar el suero de la fase celular. La obtención de sangre se realizó al día 0, 20, 40, 60 y 80.

## **Determinación de anticuerpos IgM/IgG.**

Los niveles de anticuerpos de clases IgM e IgG específicos contra las proteínas de interés se determinaron mediante ensayos de ELISA. Placas de 96 pozos (Greiner bio-one) se sensibilizaron con 50  $\mu$ L de cada una de las proteínas de interés (S1, RBD y N) a una concentración de 2  $\mu$ g/ml durante toda la noche a 4 °C. En cada pozo se colocaron 50  $\mu$ L de la preparación. Se realizó 2 lavados con PBS-Tween 0.1 % y posteriormente las placas se bloquearon con PBS Tween (0.1 %) leche al 5 % (100  $\mu$ L por pozo) durante 1 hora. Los sueros se diluyeron 1:100 en PBS-Tween Leche al 5 % y se colocaron 50  $\mu$ L por pozo. Estos se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados y se adicionó un anticuerpo goat anti-mouse IgM-HRP (Invitrogen) dilución 1:4000 o goat anti-mouse IgG-HRP (Invitrogen) dilución 1:5000. Se incubó por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el lavado de la placa y se adicionó 50  $\mu$ L por pozo de la solución reveladora (Buffer de citratos 10X, OPD, H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se incubó 15 minutos a 37 °C y posterior a esto la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Se realizó la lectura de la placa en un lector de ELISA (Multiskan FC, Thermo scientific) a una longitud de onda de 450 nm.

## **Determinación de anticuerpos neutralizantes (Neutralización simulada).**

La prueba de Neutralización simulada (SnELISA) se realizó como lo describió Abe et al (2020) con algunas modificaciones<sup>80</sup>. Se utilizaron microplacas Maxisorp ELISA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y se fijó con 50  $\mu$ L RBD (2 $\mu$ g/ml) utilizando buffer de carbonatos 50 mM pH 9.6 e incubando toda la noche a 4° C. Posteriormente, se realizó un lavado con 300  $\mu$ L de PBS y se incubó con 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo (PBS Tween 0.05 %, BSA 2 % y Glucosa 3 %) por una hora a temperatura ambiente y se lavó con 300  $\mu$ L de PBS. Se realizaron diluciones 1:20 de suero en PBS-leche al 1 % y se incubaron 50  $\mu$ L de la dilución por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados con 250  $\mu$ L de PBS

Tween 0.05 %, se incubó 50 µL de ACE2 biotinilada en PBS (2 µg/ml) y se incubó durante 30 min. Se dieron 4 lavados con 250 µL de PBST 0.05% y se incubó 50 µL de estreptavidina-HRP (1:2000) por 30 min. Se dieron 4 lavados con 250 µL de PBST 0.05 % y se incubó 50 µL de TMB por 20 min. La reacción se detuvo con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Como control se utiliza ACE2 por duplicado. Los resultados se expresan como el % de neutralización =  $(1 - (\text{densidad óptica muestra problema} / \text{densidad óptica control})) * 100$ . Las muestras con valores >35 se consideran positivos.

### **Obtención de esplenocitos.**

Los ratones inmunizados se sacrificaron mediante punción cardíaca 120 días post inmunización. Por el método anterior se realizó también el sangrado en blanco de estos animales. Se extrajo el bazo de cada animal y se colocó en una caja Petri. Los bazos de cada ratón fueron disgregados para liberar los linfocitos con ayuda de una malla metálica y el embolo de una jeringa de 5 ml. Los restos de tejido celular quedaron retenidos por la malla metálica. La suspensión celular de esplenocitos, se recuperó en 20 ml de medio RPMI y se centrifugó por 10 minutos a 1100 rpm. El paquete celular se recuperó en 10 ml de medio RPMI y se realizó el conteo celular.

### **Cultivo y estímulo de esplenocitos.**

En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron  $2 \times 10^5$  esplenocitos en un volumen total de 200 µL de medio RPMI suplementado. Las células se estimularon con 2 µg/ml de las proteínas recombinantes del SARS CoV-2 durante 48 horas. Como control positivo se empleó PMA a una concentración de 50 ng/ml y como control negativo, medio RPMI. Transcurrido el tiempo de incubación se recuperaron los sobrenadantes, se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm para eliminar restos celulares y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

## **Ensayo de CBAs.**

La determinación de citocinas secretadas por los linfocitos obtenidos del bazo de los ratones inmunizados se realizó mediante el kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine (BD) siguiendo las instrucciones del manual.

De forma inicial se preparó una curva de concentración a partir del estándar de citocinas. Se hicieron las siguientes diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256, usando como control solo diluyente. Como punto máximo de la curva se empleó estándar de citocinas sin diluir y como punto mínimo, únicamente diluyente. A continuación, se mezclaron con cada una de las citocinas a evaluar. Se adicionaron 25  $\mu$ L de la mezcla a cada tubo correspondiente a la curva de concentración. Se usaron 25  $\mu$ L de cada uno de los sobrenadantes problemas, a los cuales se les adicionó 25  $\mu$ L de la mezcla de citocinas. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 25  $\mu$ L de detector PE (Th1/Th2). Las muestras se incubaron durante 2 horas y media protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo las muestras se lavaron con 500  $\mu$ L de Wash-buffer y se centrifugaron 5 min a 2000 xg. Posteriormente se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100  $\mu$ L de Wash-Buffer. Las muestras se analizaron empleando el citómetro BD FACS Canto II.

## **Inmunofluorescencia de células infectadas con SARS CoV-2.**

Células Vero fueron plaqueadas a una densidad de  $6 \times 10^4$  células por pozo. Estas fueron infectadas con 1 MOI del virus de SARS CoV-2 en el laboratorio BSL-3 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las células se incubaron durante 24 horas y posteriormente se fijaron con 300  $\mu$ L de PFA durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS. Las células fijadas se dejaron 12 horas bajo luz UV para asegurar la inactivación del virus. Células Vero no infectadas se fijaron bajo el mismo procedimiento antes descrito.

Para la tinción de inmunofluorescencia las células Vero se permeabilizaron con 500  $\mu$ L de PBS-Tritón 0.1 % durante 1 hora. Posteriormente, se realizó un bloqueo empleando 500 $\mu$ l de una mezcla de Suero de chivo/PBS-Tritón 0.1 % por una hora. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón 0.1 % y se adicionaron los sueros de los ratones inmunizados en una dilución 1:200 Suero de chivo/PBS-Tritón, estos se dejaron incubando durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados con Suero/PBS-Tritón 0.1 % y se adicionó el anticuerpo secundario anti mouse IgG-Cy3 (Invitrogen) en una dilución 1:500 durante una hora. Posteriormente se realizaron 5 lavados empleando PBS-Tritón 0.1 % y las células se dejaron durante 10 minutos en agua. Finalmente, se adicionaron 3  $\mu$ l de Vectashield/DAPI. Las células se observaron empleando el microscopio Leica SPS8.

## Resultados.

### Cuantificación del DNA.

Los insertos sintetizados de manera comercial se amplificaron para tener un abasto suficiente de cada construcción para llevar cabo las transfecciones correspondientes. Las concentraciones que se obtuvieron fueron como lo indica la tabla 1.

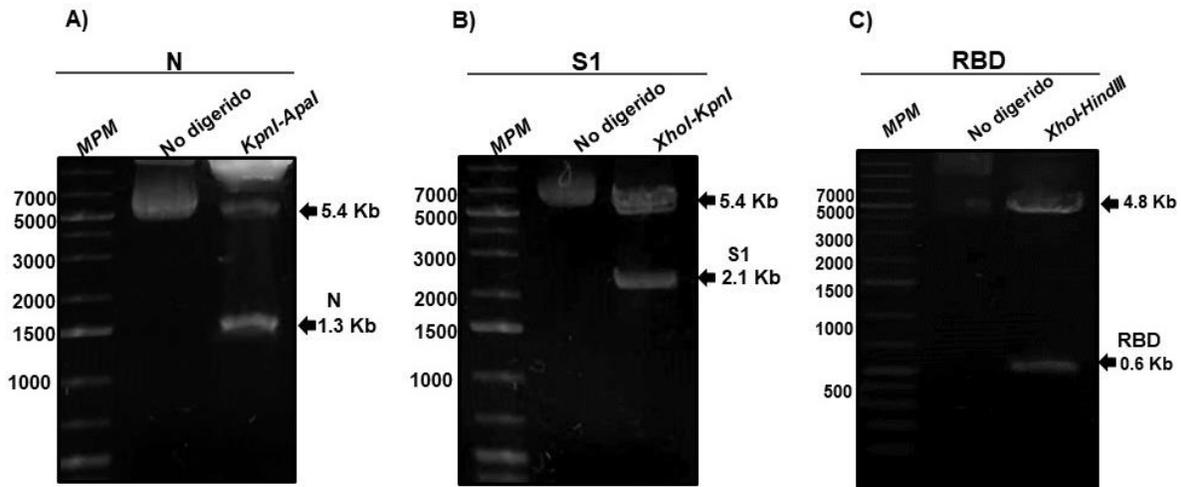
**Tabla 1.** Cuantificación del DNA plasmidico para las construcciones pcDNA3.1/N, pcDNA3.1/S1 y pCAGGS/RBD

Construcción	Concentración
pcDNA3.1/N	2000 ng/ $\mu$ l
pcDNA3.1/S	1500 ng/ $\mu$ l
pCAGGS/RBD	1900 ng/ $\mu$ l

### Caracterización de las construcciones pcDNA3.1/S1 pcDNA3.1/N.

Las construcciones se analizaron con las enzimas de restricción correspondientes y se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (Figura 11). Para los tres incisos el primer carril corresponde al marcador de pares de bases y el según carril, al plásmido sin digerir. En los carriles donde se colocaron los plásmidos sin digerir se observan bandas por arriba de los 5000 pb. En contraste en los carriles donde se corrieron los plásmidos digerido se observan 2 bandas, una de mayor tamaño correspondiente al plásmido (pcDNA3.1 o PCAGSS) y una banda de menor tamaño correspondiente al inserto. En el inciso A de la figura 11 se observa en el tercer carril una primer banda con una tamaño de 5.4 Kb que corresponde al plásmido pcDNA3.1 y una segunda banda con un tamaño de 1.3 Kb que corresponde al inserto N. En el inciso B se observa en el tercer carril una primer banda con un tamaño de 5.4 Kb que corresponde al plásmido pcDNA3.1 y una segunda banda con un tamaño de 2.1 Kb que corresponde al inserto S1.

Finalmente, en el inciso C se observa en el tercer carril una primer banda con un tamaño de 4.8 Kb que corresponde al plásmido PCAGGS y una segunda banda con un tamaño de 0.6 Kb correspondiente al inserto de RBD.

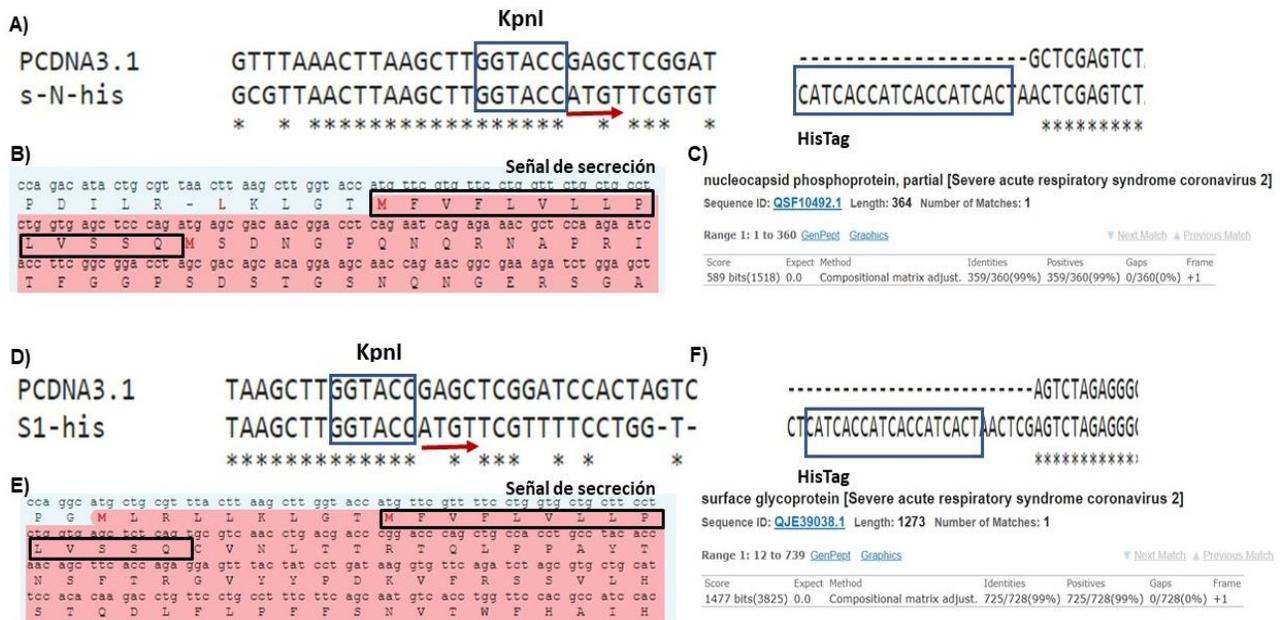


**Figura 11 Patrón electroforético de la digestión de plásmidos N, S1 y RBD.** Los plásmidos de las construcciones de interés fueron digeridos con las enzimas de digestión correspondientes: pcDNA3.1/N (KpnI-ApaI), pcDNA3.1/S1 (XhoI-KpnI) y PCAGGS/RBD (XhoI-HindIII). Estos se analizaron en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. Carril 1; marcador de DNA, carril 2; plásmido sin digerir, carril 3; plásmido digerido.

## Análisis de secuencias de los plásmidos.

Las tres construcciones fueron secuenciadas por la empresa Macrogen. Con las secuencias obtenidas experimentalmente se realizó un alineamiento de las secuencias obtenida de los plásmidos diseñados por nuestro grupo de trabajo (s-N-His y S1-His) con la secuencia del vector pcDNA3.1, para esto se empleó la plataforma Clustal Omega. Se corroboró que la secuencia de interés se encontraba en marco de lectura. En la Figura 12 se marcan la secuencia flanqueada por las enzimas correspondientes, así como la secuencia codificante para el Tag de histidinas. Empleando la plataforma ExPASyTool Translate se obtuvo la secuencia de aminoácidos, en la figura 12 se señalan los aminoácidos que forman parte de la señal de secreción. Mediante la herramienta BLAST se determinó que las

secuencias experimentales obtenidas correspondían a la proteína S y N del SARS CoV-2.



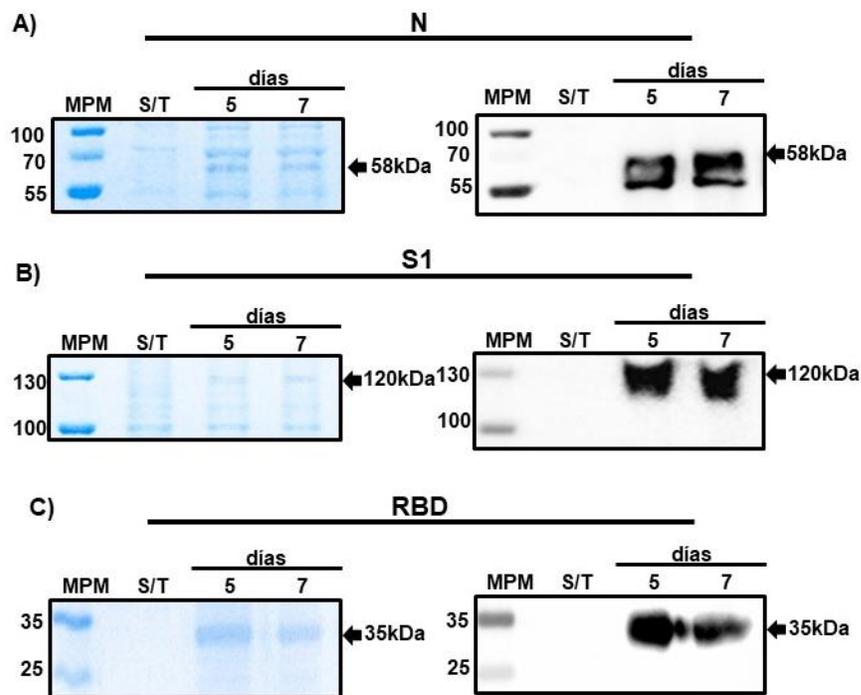
**Figura 12. Comparación y alineamientos de las secuencias.** Los datos de secuenciación se analizaron en las plataformas Clustal Omega, Expsay Tool Translate y BLAST. Las flechas rojas señalan el marco de lectura (A y D). En los recuadros se señala la secuencia de secreción y el Tag de Histidinas (B y E). El BLAST muestra que las secuencias de los plásmidos corresponden a las proteínas S y N del SARS CoV-2 (C y F).

## Evaluación de la expresión de proteínas recombinantes.

Una vez que las células Expi293 fueron transfectadas con las construcciones pcDNA3.1/N, pcDNA3.1/S1 y pCAGGS/RBD, los sobrenadantes se analizaron al día 5 y 7 en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie para analizar la presencia de alguna banda extra con el peso molecular correspondiente a cada proteína. Como controles se emplearon sobrenadantes de células Expi293 sin transfectar (Figura 13).

Al analizar los geles teñidos con azul Coomassie, en los sobrenadantes de las células transfectadas con pcDNA3.1/N se observaron bandas por arriba de los 50 kDa. En

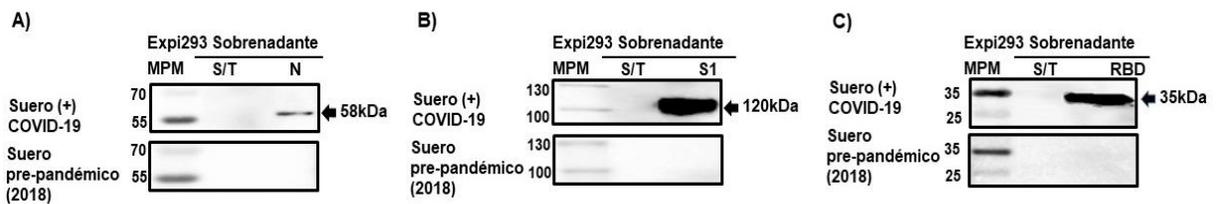
los sobrenadantes de las células transfectadas con pcDNA3.1/S1 se aprecia una banda cercana a los 130 kDa y con pCAGGS/RBD se observa una banda cercana a los 35 kDa. Ninguna de estas bandas se observó en las células no transfectadas. Las tres proteínas contienen una bandera de histidinas, por lo que para el Western Blot se empleó un anticuerpo anti Histidinas acoplado a HRP (Figura 13). En el sobrenadante de células transfectadas con N (Figura 13A) se observan 2 bandas una de 55 kDa y otra de 58 kDa aproximadamente. De acuerdo a la literatura, la banda de mayor tamaño corresponde a la proteína N glicosilada, mientras que la banda de 55 kDa corresponde a la proteína N sin glicosilar. En el sobrenadante de células transfectadas con S1 (Figura 13B) se observa una banda de 120 kDa. Mientras que en el sobrenadante de células transfectadas con RBD (Figura 13C) se observa una banda de 35 kDa. El peso de las bandas observadas corresponde con el estimado para cada una de las proteínas recombinantes.



**Figura 13. Los sobrenadantes de las células Expi293 transfectadas, expresan las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2.** Los sobrenadantes de células Expi293 transfectadas con las construcciones pcDNA3.1/N, pcDNA3.1/S1 y pCAGGS/RBD fueron analizados 5 y 7 días post transfección. El panel de la izquierda corresponde a geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie. Primer carril, marcador de peso molecular, segundo carril, sobrenadante de células no transfectadas, tercer carril, sobrenadante 5 días posttransfección, cuarto carril, sobrenadante 7 días posttransfección. Panel derecho, WB con anticuerpo anti-histidinas. Primer carril, marcador de peso molecular, segundo carril, sobrenadante de células no transfectadas, tercer carril, sobrenadante 5 días

postransfección, cuarto carril, sobrenadante 7 días postransfección. Las flechas señalan la banda correspondiente a la proteína de interés.

Con la finalidad de identificar a las proteínas recombinantes, se empleó como anticuerpo primario el suero de individuos recuperados de COVID-19 en un ensayo de Western blot con los sobrenadantes de las células transfectadas. Como un control negativo se empleó suero pre-pandémico del año 2018. De acuerdo a la Figura 14 se observó que los anticuerpos presentes en los individuos recuperados de COVID-19 reconocen a las 3 proteínas recombinantes. Este dato indica que las proteínas recombinantes poseen determinantes antigénicos presentes en las proteínas nativas del virus SARS CoV-2. El reconocimiento de las proteínas recombinantes del SARS CoV-2 no se dio al emplear el suero pre-pandémico.

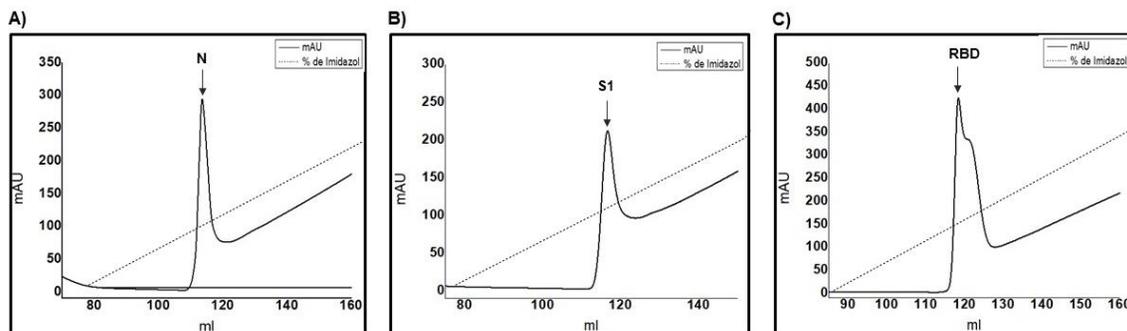


**Figura 14. Los anticuerpos presentes en el suero de individuos recuperados de COVID-19 reconocen las proteínas recombinantes N, S1 y RBD.** Los Sobrenadantes de células transfectadas con las proteínas recombinantes fueron analizado por Western Blot. Como anticuerpo primario se empleó suero de individuos recuperados por COVID-19. Como control negativo se emplearon con suero pre-pandémico del año 2018. A) Sobrenadante de células transfectadas con pcDNA3.1/N, B) Sobrenadante de células transfectadas con pcDNA3.1/S1. C) Sobrenadante de células transfectadas con pCAGGS/RBD.

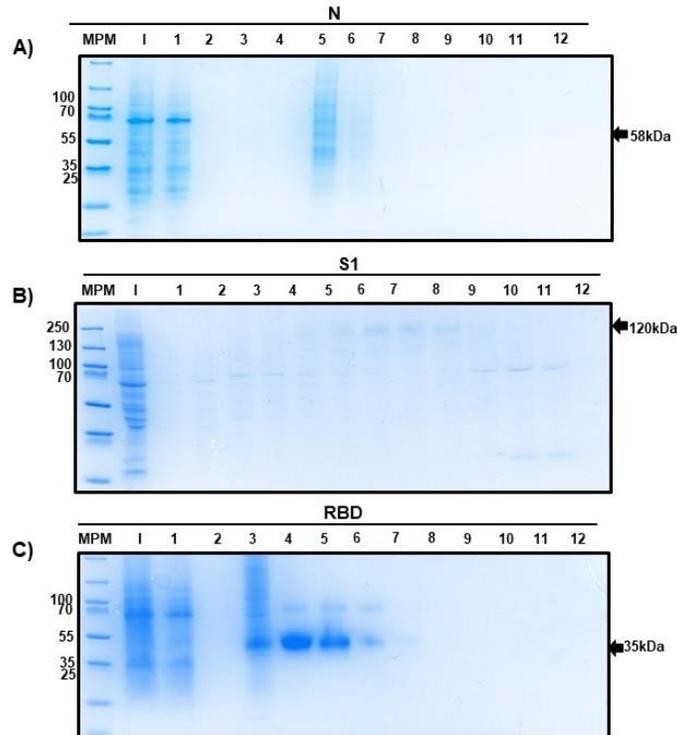
## Producción y purificación de las proteínas recombinantes.

La producción del abasto de proteínas recombinantes se llevó a cabo a partir de la transfección de 100 ml de cultivo celular a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/ml. Debido a que las proteínas recombinantes poseen una bandera de histidinas, éstas se purificaron empleando una columna HisTrap. Esta columna se encuentra cargada

con níquel. El  $\text{Ni}^{2+}$  se coordina con el grupo imidazol de las histidinas y permite la retención de las proteínas que contengan esta bandera. Los sobrenadantes recolectados al día 7 postransfección se inyectaron en la columna antes mencionada. Debido a que el imidazol se encuentra en alta concentración (500 mM) en el buffer B, es capaz de desplazar a las histidinas previamente unidas a la columna, provocando así la elución de estas. Se realizó la elución con un gradiente lineal de Imidazol y se observó la elución de las proteínas al 30 % de imidazol, equivalente a una concentración de 150mM. Este proceso se monitoreó mediante un cromatograma en donde se grafican las fracciones (ordenada X) y en la ordenada Y se representan las absorbancias de las proteínas eluidas (Figura 15). En este primer paso de afinidad se obtuvieron un promedio de 15 fracciones, cada una con un volumen de 5 ml. Estas fracciones se analizaron en un gel de poliacrilamida y se tiñeron con azul Coomassie (Figura 16). Aquellas fracciones enriquecidas con las proteínas de interés se mezclaron y concentraron mediante tubos centricones a un volumen final de 1 ml. Este mililitro de proteína concentrada fue inyectado a una columna de exclusión molecular (Superdex 75/Superdex 200 10/300 GL).



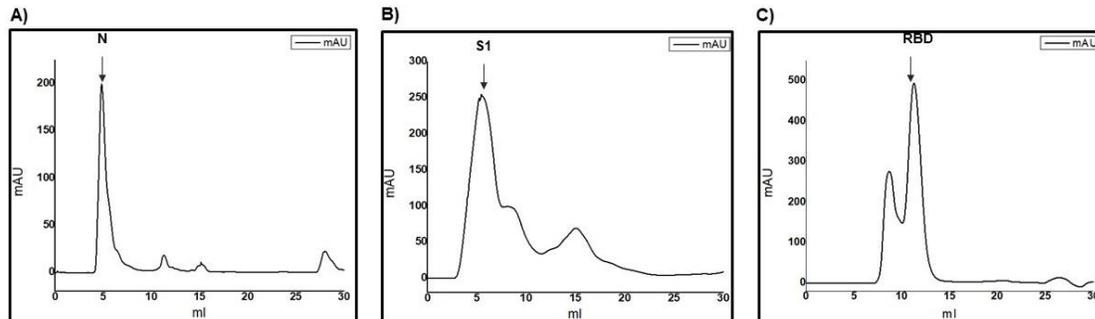
**Figura 15. Cromatogramas de purificación por columna de afinidad.** La purificación por afinidad se monitoreó midiendo la absorbancia de las proteínas contenidas en las fracciones eluidas. La lectura se realizó a 280 nm y se graficó en mAU (eje X) contra el volumen de elución (eje Y). Los picos de mayor tamaño corresponden a las fracciones enriquecidas con las proteínas de interés.



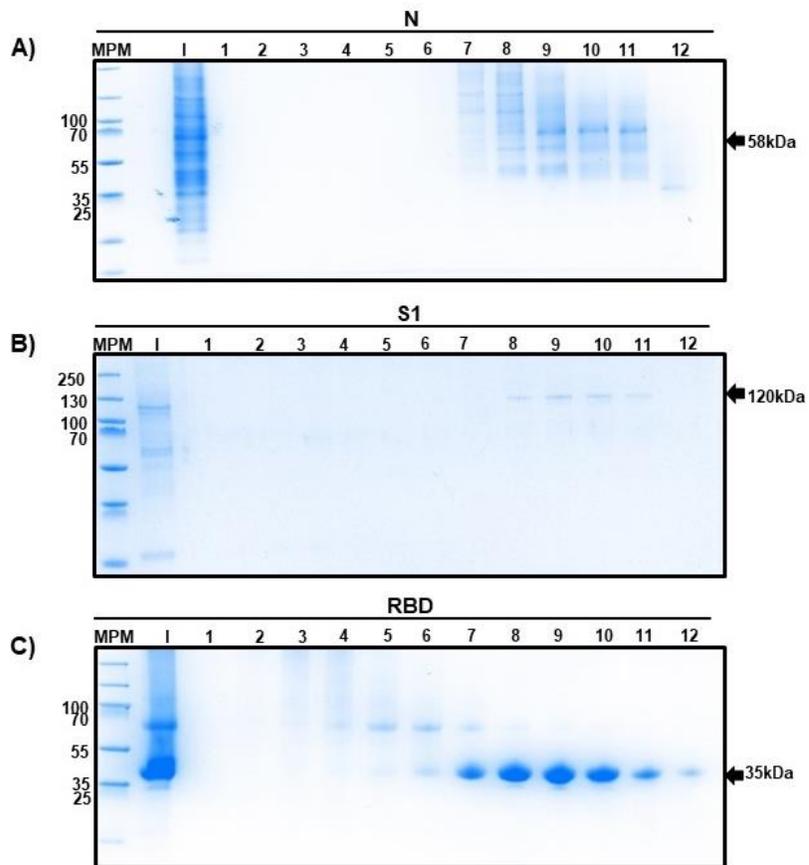
**Figura 16. Análisis de fracciones obtenidas en el proceso de purificación por afinidad.** Para la purificación por afinidad se empleó una columna Histrap HP (Cytiva). Posterior a la inyección de los sobrenadantes se realizó la elución empleando un gradiente de Imidazol 500 mM. Las fracciones obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie. Primer carril, marcador de peso molecular, segundo carril, input, carriles restantes, fracciones eluidas.

La elución en el proceso de exclusión molecular se realizó con PBS. Este proceso se monitoreó mediante un cromatograma que representa las absorbancias emitidas por las proteínas eluidas (Figura 17). Se observó que para la proteína N el pico máximo se alcanza 8 ml después del inicio de la elución, para la proteína S1 el pico máximo fue a los 3 ml y para la proteína RBD a los 11 ml posteriores al inicio de la elución. En este proceso de exclusión molecular se obtuvieron de 15 fracciones de 500µl las cuales se analizaron mediante geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie (Figura 18).

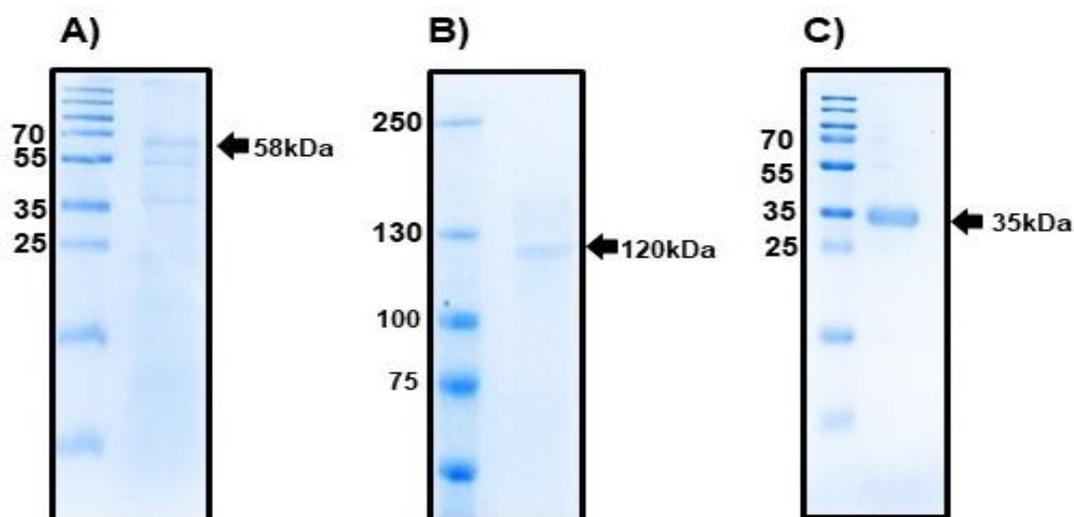
Las fracciones enriquecidas con las proteínas de interés se mezclaron. Para la proteína N se seleccionaron las fracciones 9-11, para la proteína S1 las fracciones 8-11 y para la proteína RBD las fracciones 7-12. La mezcla de estas fracciones se analizó nuevamente en un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie para determinar la pureza de las proteínas obtenidas (Figura 19). Se observó una banda de 58kDa para N, una banda de 120kDa para S1 y una banda de 35kDa para RBD. Mediante el kit de Bradford se realizó la cuantificación de las proteínas obtenidas. Los rendimientos obtenidos por 100 ml de cultivo fueron los siguientes; N 1mg, S1 1.5mg y RBD 4mg.



**Figura 17. Cromatogramas de purificación por columna de exclusión molecular.** La purificación por exclusión molecular se monitoreó midiendo la absorbancia de las proteínas contenidas en las fracciones eluidas. La lectura se realizó a 280 nm y se graficó en mAU (eje X) contra el volumen de elución (eje Y). Los picos de mayor tamaño corresponden a las fracciones enriquecidas con las proteínas de interés.



**Figura 18. Análisis de fracciones obtenidas en el proceso de exclusión molecular.** Para la purificación por exclusión molecular se empleó una columna Superdex 75 10/300 GL (RBD y N) o Superdex200 increase 10/300 GL (S1). Las fracciones seleccionadas del proceso de afinidad se inyectaron en la columna y fueron eluidas con PBS. Las fracciones obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomasie. Primer carril, marcador de peso molecular, segundo carril, input, carriles restantes, fracciones eluidas.

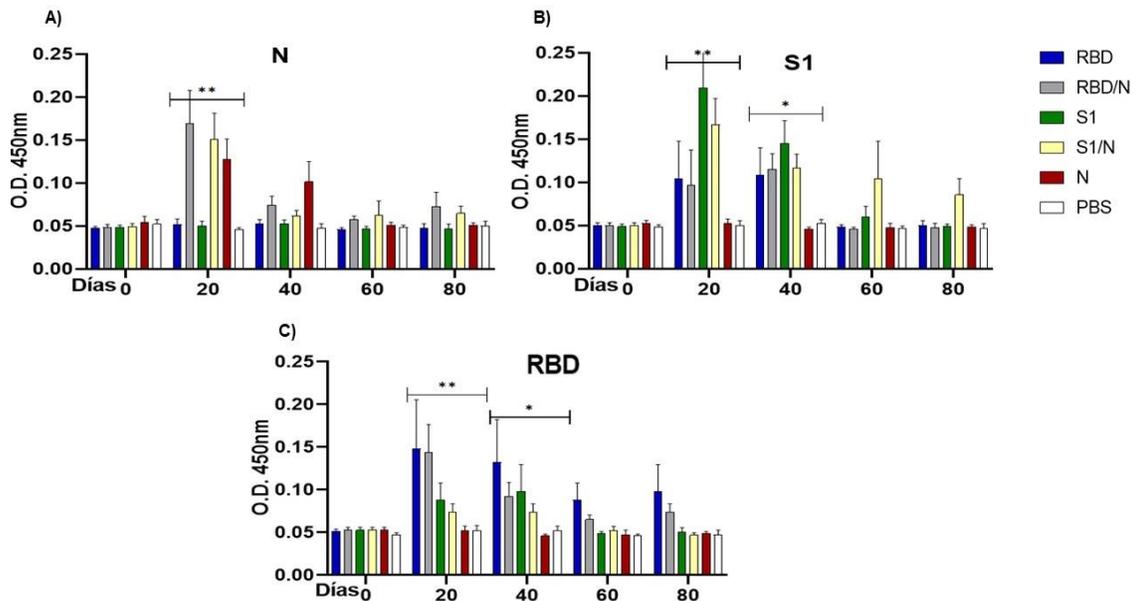


**Figura 19. Análisis de pureza de las proteínas recombinantes.** Las proteínas obtenidas del proceso de exclusión molecular se mezclaron, cuantificaron y analizaron en un gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie para determinar la pureza de estas.

### **Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG en los ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes.**

Una vez que los ratones fueron inmunizados con las proteínas recombinantes N, S1 y RBD de forma individual o en combinación (Figura 10) se analizó la respuesta inmune humoral hacia las proteínas recombinantes del SARS CoV-2. Todos los grupos de los ratones inmunizados con las diferentes proteínas fueron sangrados al día 0 (suero pre inmune) y al día 20, 40, 60 y 80 post inmunización. En la figura 20 se muestran los resultados de la respuesta de anticuerpos IgM, los niveles de anticuerpos se representan en DO, se grafica la media de los 10 ratones que corresponden a cada uno de los grupos de estudio. La Fig. 20 A muestra los niveles de anticuerpos IgM contra la proteína de nucleocápside. Como se esperaba, únicamente se detectaron anticuerpos IgM contra N en los grupos N, S1/N y RBD/N. Se observó que los niveles máximos de anticuerpos IgM contra esta proteína se alcanzaron al día 20 post inmunización. En este mismo día, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgM N en los grupos N, S1/N y RBD/N con respecto a los grupos control RBD, S1 y PBS. Se

observó también que conforme transcurren los días, los niveles de anticuerpos IgM contra la proteína N disminuyen.



**Figura 20. Las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos específicos de clase IgM.** La respuesta de anticuerpos de clase IgM contra las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2 se evaluó mediante ensayos de ELISA 20, 40, 60 y 80 días post inmunización. Se analizó el suero de 10 ratones para cada grupo en una dilución 1:50. Cada barra representa uno de los 6 grupos empleados.

La grafica 20B muestra la respuesta de anticuerpos de clase IgM contra la proteína S1 representada como DO en los 6 grupos de ratones inmunizados. Se observan anticuerpos IgM contra S1 en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N. Apreciamos nuevamente el pico máximo de anticuerpos IgM al día 20 post inmunización, y una disminución de estos al transcurrir los días. En el día 20 y 40 post inmunización se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgM S1 en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N con respecto a los grupos control N y PBS.

La gráfica 20C muestran los anticuerpos específicos IgM contra el dominio RBD, nuevamente se analizaron los 6 grupos inmunizados con las diferentes proteínas.

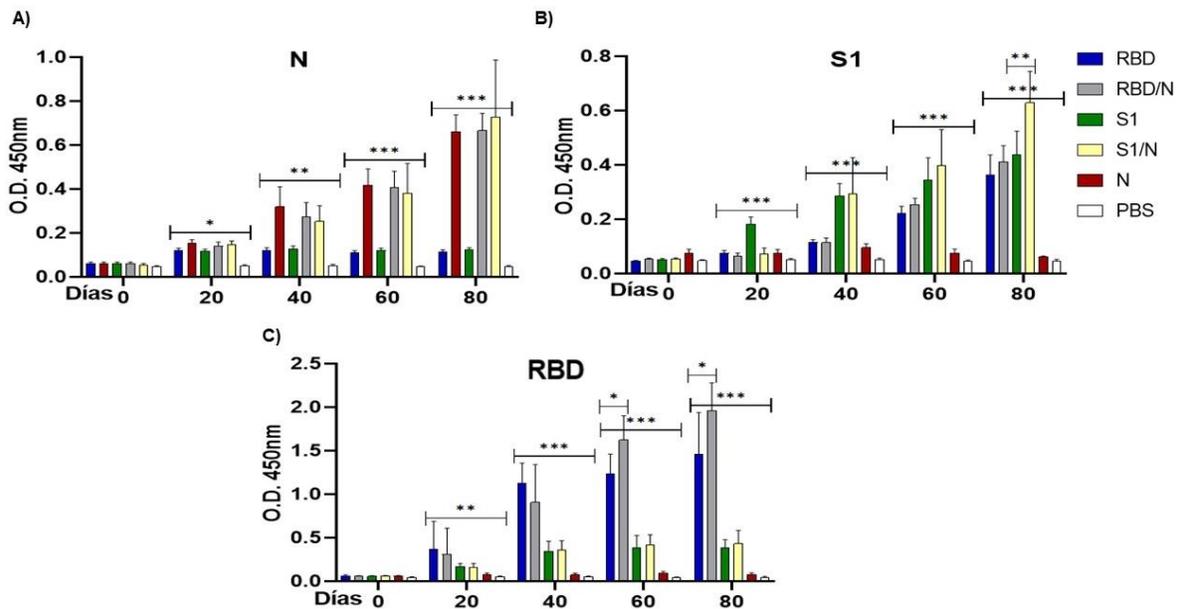
Se detectaron anticuerpos IgM RDB en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N, el pico máximo se observó nuevamente al día 20. En el día 20 y 40 post inmunización se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgM RBD en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N con respecto a los grupos control N y PBS.

Con los mismos sueros se realizaron ensayos de ELISA para analizar ahora la respuesta específica IgG contra las 3 proteínas recombinantes. En la figura 21 se muestran los resultados de la respuesta de anticuerpos IgG, los niveles de anticuerpos se representan en DO, se grafica la media de los 10 ratones que corresponden a cada uno de los grupos de estudio.

La gráfica 21A corresponde a los anticuerpos IgG contra la proteína N. Se observan anticuerpos IgG contra N en los grupos N, S1/N y RBD/N. Al comparar los niveles de anticuerpos IgG contra N en los grupos antes mencionados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante la cinética. Por el contrario, se observa una clara respuesta de anticuerpos específicos contra la proteína N en contraste con los grupos inmunizados con PBS, S1 o RBD. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. La figura 21B muestra los anticuerpos específicos IgG contra la proteína S1 para cada grupo. Se observan anticuerpos IgG contra S1 en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N. De manera interesante, la respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína S1 fue mayor al día 80 en el grupo de ratones inmunizados con la mezcla de antígenos S1/N en comparación con el grupo de ratones inmunizados solo con la proteína S1. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. Se encontró también una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgG S1 en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N con respecto a los grupos control N y PBS.

La figura 21C muestra los anticuerpos específicos IgG contra la proteína RBD para los 6 grupos de ratones. Se observan anticuerpos IgG contra RBD en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N. De manera interesante, la respuesta de anticuerpos IgG

contra la proteína RBD fue mayor en el día 60 y en el día 80 en el grupo de ratones inmunizados de forma combinada con RBD/N en comparación con el grupo de ratones inmunizados solo con la proteína RBD. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. Se encontró también una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos IgG RBD en los grupos S1, RBD, S1/N y RBD/N con respecto a los grupos control N y PBS.



**Figura 21. Las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos específicos de clase IgG.** La respuesta de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2 se evaluó mediante ensayos de ELISA 20, 40, 60 y 80 días post inmunización. Se analizó el suero de 10 ratones para cada grupo en una dilución 1:50.

### Evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en los grupos de ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes.

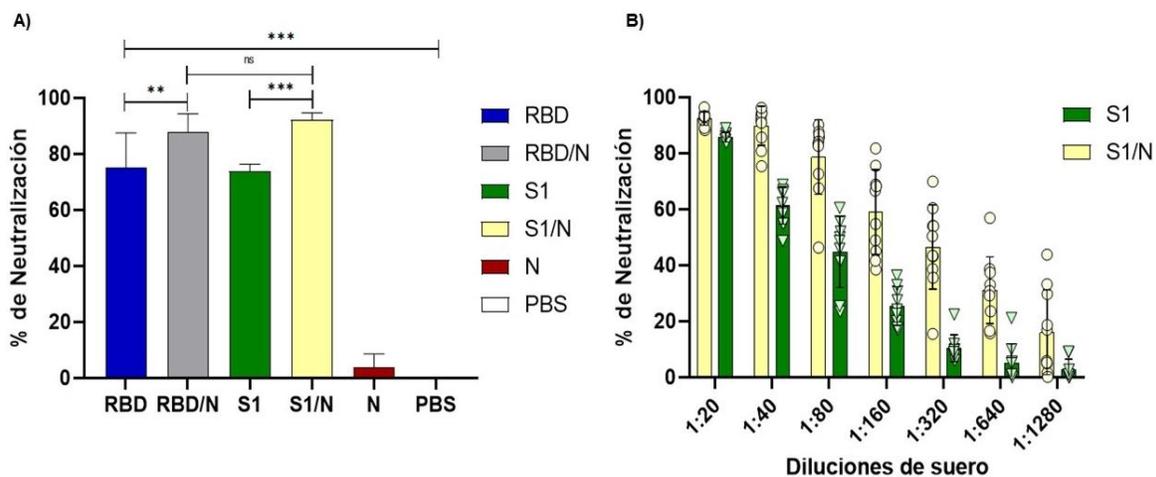
A pesar que los tres antígenos (S1, RBD y N) son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG, esto solo es un indicativo que las proteínas empleadas son inmunógenos eficientes. Reiteradamente se ha

demostrado que la respuesta inmune protectora contra COVID 19 está basada en la presencia de anticuerpos neutralizantes. Debido a lo anterior, se llevó a cabo la evaluación del potencial de neutralizante de los anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes en los diversos grupos de ratones.

Los ensayos convencionales para evaluar neutralización requieren el empleo del virus, debido a que el manejo del SARS CoV-2 requiere condiciones de bioseguridad nivel 3, por ello se han desarrollado estrategias para evaluar la actividad neutralizante de los anticuerpos. En este estudio empleamos un ensayo basado en la interacción del receptor ACE2 con la proteína RBD. Esta metodología fue desarrollada por el grupo de Investigación del Dr. Jesús Hernández López del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. El ensayo antes mencionado permite detectar anticuerpos neutralizantes contra el SARS CoV-2 que bloquean la interacción entre el dominio RBD con el receptor de ACE2. La interacción proteína-proteína entre RBD/ACE2 puede inhibirse si en los sueros a evaluar se encuentran presentes anticuerpos neutralizantes contra el dominio RBD del SARS CoV-2.

La capacidad neutralizante de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2 se muestra en la Figura 22. Los resultados se representan como la media del porcentaje de neutralización para los 10 ratones de cada grupo (en el eje de las X). En el eje de las “y” se muestran los grupos de ratones empleados. Observamos actividad neutralizante en los grupos de S1, RBD, S1/N y RBD/N. No se observó neutralización en los sueros de ratones de los grupos N y PBS. De manera interesante observamos un porcentaje de neutralización mayor en los grupos inmunizados de forma combinada, S1/N y RBD/N, con respecto a los grupos inmunizados con un solo antígeno. La diferencia encontrada fue estadísticamente significativa. Sin embargo, al comparar los niveles de neutralización entre los grupos S1/N y RBD/N, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. A pesar que la diferencia entre los 2 grupos antes mencionados no fue estadísticamente significativa, observamos una tendencia a

niveles mayores de anticuerpos neutralizantes en el grupo S1/N. Por lo anterior, se decidió realizar una titulación de los sueros para este grupo, Figura 22B. En la tabla 2 se muestra el título de anticuerpos neutralizantes para cada uno de los ratones del grupo S1 y S1/N. Podemos observar que para el grupo S1/N en una dilución 1:320 el 80 % de los ratones anticuerpos neutralizantes. Por el contrario, en el grupo S1 en una dilución 1:80 el 70 % de los ratones presentan anticuerpos neutralizantes. El dato anterior refuerza nuestra teoría que una inmunización combinada con la proteína N induce una respuesta inmune más robusta.



**Figura 22. Las proteínas recombinantes S1 y RBD del SARS CoV-2 inducen anticuerpos neutralizantes.** A) Se analizó el suero de los 10 ratones de cada grupo en una dilución 1:20. Se observó actividad neutralizante en los sueros provenientes de los ratones de los grupos RBD, RBD/N, S1 y S1/N B) Los sueros de los ratones correspondientes a los grupos S1 y S1/N se analizaron en diferentes diluciones. Los sueros del grupo S1/N presentaron títulos mayores de neutralización en comparación con los sueros del grupo S1.

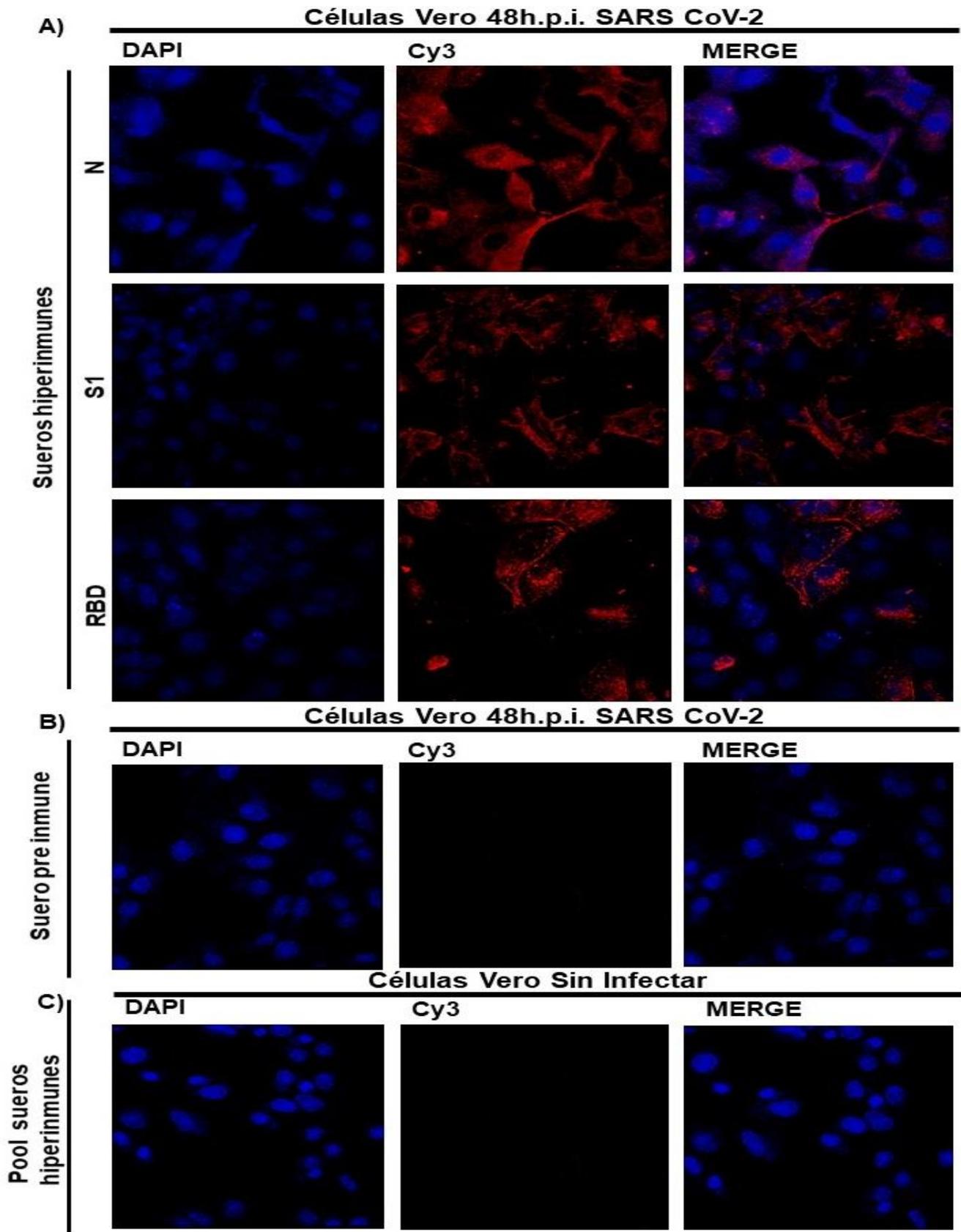
Tabla 2. Títulos de anticuerpos neutralizantes en los grupos S1 y S1/N

Número de Ratón	Título de anticuerpos neutralizantes	
	S1/N	S1
1	1:1280	1:160
2	1:640	1:80
3	1:320	1:40
4	1:640	1:80
5	1:320	1:40
6	1:320	1:80
7	1:320	1:80
8	1:320	1:80
9	1:160	1:80
10	1:320	1:80

**El suero de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, reconoce al virus SARS CoV-2 en células infectadas.**

Para determinar si los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con las proteínas N, S1 y RBD son capaces de reconocer al virus SARS CoV-2 en su forma nativa, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células VERO infectadas con este virus. En la figura 23 se muestran células Vero 48 horas post infección, en color azul se observan los núcleos teñidos con DAPI.

En el panel superior se empleó suero con anticuerpos contra la proteína N, la presencia de esta proteína se observa alrededor de los núcleos. La presencia de la proteína S y RBD se observa distribuida por todo el citoplasma de las células infectadas. Estos sueros policlonales se evaluaron también en células Vero no infectadas, no se observó un reconocimiento inespecífico por parte de estos. Por otra parte, los sueros de los ratones inmunizados con PBS tampoco mostraron un reconocimiento inespecífico al ser evaluados en células Vero infectadas.

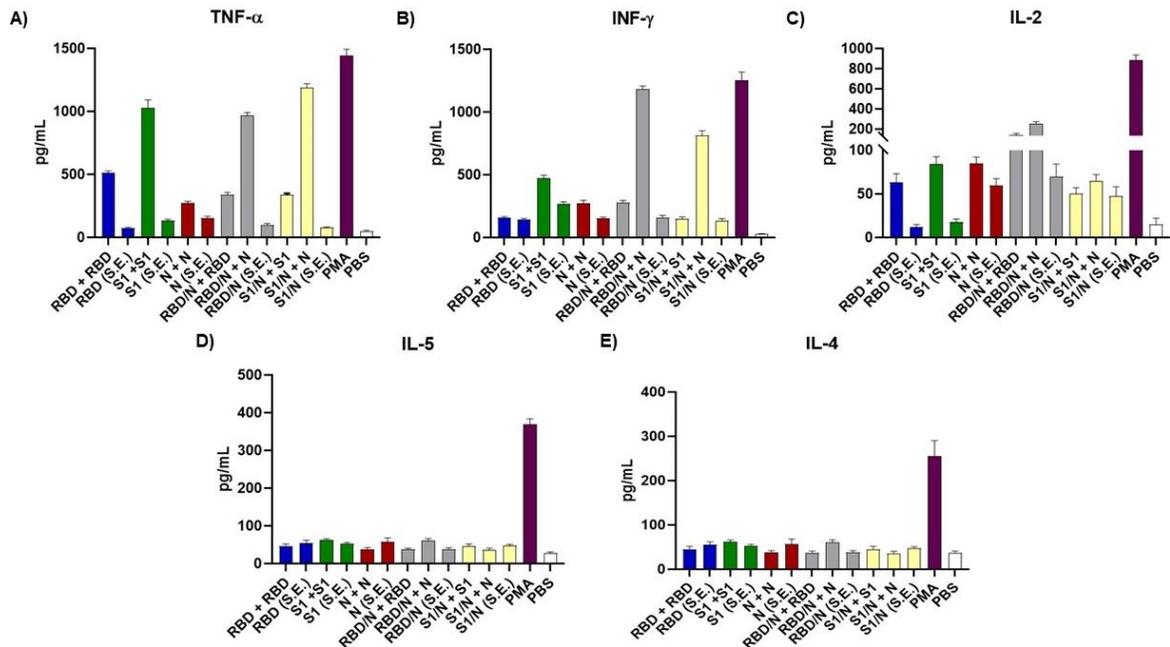


**Figura 23. Los anticuerpos presentes en los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes, reconocen al virus SARS CoV-2 en su forma nativa.** Células Vero fueron infectadas durante 48 horas con 1 MOI del virus SARS CoV2. Se realizó inmunofluorescencia empleando como anticuerpo primario los sueros de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2. Se observa el reconocimiento del virus por estos sueros(rojo).

## **Respuesta de células T.**

La respuesta inducida por la proteína S1 y RBD la pudimos detectar por medio de la detección de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, estudios preclínicos en SARS CoV y SARS CoV-2 sugieren que las células T también son capaces de brindar un efecto protector ante la infección por estos virus<sup>73,81</sup>. Este efecto es atribuido a la capacidad de las células T, CD4+, de producir IFN- $\gamma$ . Se conoce también que citocinas producidas por las células TCD4 cooperadoras permiten la maduración de las células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Debido a lo anterior, se decidió evaluar la capacidad de respuesta de las células T totales, del bazo de los ratones inmunizados, ante estímulos con las proteínas recombinantes del SARS CoV-2. Se obtuvieron los esplenocitos de los ratones inmunizados y estos se estimularon con 2 $\mu$ g de las proteínas N, S1 y RBD durante 48 horas.

Transcurrido el estímulo se analizó la presencia de diferentes citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-5 en el sobrenadante. Posterior a los estímulos se evaluó la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. Se observaron niveles mayores de estas 3 citocinas en los grupos RBD/N y S1/N en comparación a los grupos RBD y S1(Figura 24).



**Figura 24. El estímulo con las proteínas recombinantes induce la producción de citocinas en los esplenocitos de los ratones inmunizados.** Células provenientes del bazo de los ratones inmunizados fueron estimulados con las proteínas N, S1 y RBD del SARS CoV-2. Se emplearon como controles células sin estimular (S.E.) 48 horas pos estímulo, se determinó mediante CBAs los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-5 en los sobrenadantes de estas células.

## Discusión.

A julio de 2021 la OMS reporta 184'547,730 casos de COVID-19 a nivel mundial y 3'993,056 defunciones<sup>4</sup>. Esta enfermedad ha afectado tanto a países de primer mundo y aquellos que se encuentran en vías de desarrollo. Aspectos relacionados con la capacidad económica, política y los sistemas de salud han influenciado en el combate de la COVID-19. Algunos países aparte de lidiar con el SARS CoV-2, han tenido que lidiar con enfermedades endémicas consideradas como un problema de salud pública<sup>82</sup>. A pesar que se han desarrollado vacunas eficaces contra el SARS CoV-2 y que las aplicaciones de estas han logrado controlar este virus, la distribución de estas hasta la fecha no ha sido equitativa. A enero de 2021 el 95 % de las vacunas en contra del SARS CoV-2 había sido adquiridos por países con un alto poder adquisitivo<sup>82,83</sup>. Lo anterior provoca una escasez de vacunas contra el SARS CoV-2 para los países en vías de desarrollo y de bajos ingresos. Por otra parte, muchas vacunas que actualmente se encuentran en aplicación, emplean tecnologías de vanguardia que no pueden ser implementadas tan fácilmente en países en vías de desarrollo. Por lo anterior, es importante tener en cuenta vacunas seguras, eficaces y accesibles para el sector de la población mundial antes mencionado<sup>82,84</sup>. Por otra parte, el surgimiento de variantes para el SARS-CoV-2 ha provocado cierta eficacia de algunas vacunas que actualmente se encontraban en aplicación.

El desarrollo de vacunas contra el SAR CoV-2 ha sido uno de los temas y uno de los retos más importantes durante los últimos meses. Para este proceso se han implementado diversas plataformas, tales como vacunas basadas en virus atenuados o inactivados, vectores adenovirales, proteínas recombinantes o tecnologías de ácidos nucleicos como RNA<sup>67</sup>. El punto medular del diseño de cualquier vacuna es la elección de un antígeno capaz de inducir respuestas inmunes tanto humorales como celulares. En este sentido la presencia de otros coronavirus tales como SARS CoV y MERS causantes de brotes muy graves han proporcionado conocimientos importantes en el desarrollo de vacunas.

Ha resultado importante también la evaluación de la inmunogenicidad de estos candidatos vacunales en estudios preclínicos. Los modelos animales empleados deber ser permisivos a la infección y, en la medida de lo posible, reproducir la patología observada en humanos<sup>85</sup>. Para el estudio de candidatos vacunales y fármacos contra el SARS CoV-2 se han empleado animales como ratones, hámsteres, hurones y primates no humanos<sup>86,87</sup>.

Debido a que la proteína Spike presenta poca afinidad con el receptor ACE-2 murino, cepas de ratones wild type como BALB/c y C57BL/6, no permiten una replicación viral adecuada ni el desarrollo de la enfermedad comparable a la observada en humanos. No obstante, estas cepas son útiles para evaluar la inmunogenicidad de antígenos, así como el desarrollo de anticuerpos mono y policlonales<sup>85-87</sup>. Para solucionar lo anterior se han desarrollado ratones transgénicos K18-hACE2. Este ratón expresa el receptor ACE2 humano en sus células epiteliales pulmonares y desarrolla una infección viral moderada. Por otra parte, Sun y colaboradores por medio de un vector adenoviral (ade5-hACE2) lograron la expresión transitoria del receptor ACE2 humano en las células epiteliales pulmonares de ratones BALB/c y C57BL/6. Estos animales permitieron la replicación viral del SARS-CoV-2<sup>88</sup>.

Otro modelo animal empleado es el hámster sirio. Este animal permite una adecuada replicación viral del SARS CoV-2 y genera manifestaciones clínicas similares a una infección moderada<sup>89</sup>. Por otra parte, el modelo de hurón permite también una replicación viral eficiente, así como el desarrollo de una sintomatología clínica similar al COVID-19 moderado-severo. Sin embargo, el manejo de estos animales es costoso<sup>90</sup>. Finalmente, el modelo de primates es el más adecuado ya que al encontrarse filogenéticamente más cerca a los seres humanos, permite un estudio más apto de la replicación viral y por consiguiente una mejor evaluación de candidatos vacunales y fármacos. Sin embargo, estos animales son más difíciles de manipular y no se puede contar con ellos en cualquier laboratorio<sup>91</sup>.

Las vacunas aprobadas se basan en su mayoría en Adenovirus y RNA. A pesar que estudios preclínicos y clínicos han demostrado la efectividad de estas<sup>71,92</sup>, se requieren condiciones estrictas de cadena fría para mantener en condiciones ideales estas vacunas, es decir, las tecnologías para su producción son costosas. Con base en los puntos anteriores, el empleo de vacunas basadas en proteínas recombinantes es una mejor alternativa<sup>84,93</sup>. Actualmente vacunas como la de influenza y la hepatitis B, que son administradas de forma segura y eficaz en la población en general, están basadas en proteínas recombinantes<sup>85</sup>. Los estudios en SARS CoV-2 determinaron la capacidad inmunogénica de las proteínas S y N de este virus. En este proyecto se decidió generar las proteínas recombinantes de nucleocápside, así como la subunidad S1 y RBD de la proteína Spike del virus SARS CoV-2. Hasta la fecha, son pocos los estudios que proponen una inmunización combinada de más de un antígeno del SARS CoV-2 para conferir una inmunidad protectora.

Actualmente, se cuenta con diversos sistemas de expresión para generar proteínas recombinantes. De estos, el más empleado es el sistema bacteriano, el cual ofrece un gran rendimiento de expresión, pero no realizan modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones<sup>94</sup>. Sin embargo, para este proyecto se decidió utilizar un sistema de expresión eucarionte, para garantizar no solo el plegamiento adecuado sino también las modificaciones postraduccionales (MPT) de la proteína de interés. La proteína S se encuentra altamente glicosiladas<sup>14,17,95</sup> y en la proteína N se han reportado 2 sitios susceptibles de glicosilaciones<sup>23</sup>. Las proteínas expresadas en bacterias suelen encontrarse en cuerpos de inclusión, por lo que, para su obtención es necesario realizar procesos de lisis, desnaturalización y replegamiento. Estos procesos afectan la estructura terciaria de estas proteínas<sup>94</sup>. Las proteínas en este estudio se diseñaron con una señal de secreción que permite recuperarlas del sobrenadante celular, lo anterior nos garantiza que estas se encontrarán en una estructura terciaria o cuaternaria adecuada. La estructura es muy importante, ya que es bien sabido que muchos anticuerpos reconocen épitopos conformacionales<sup>96</sup>.

Aunque los sistemas eucariontes son más costosos estos permiten expresar glicoproteínas en su estructura nativas y con MPT<sup>84</sup>. Líneas celulares como CHO y HEK293 se han empleado para expresar distintas proteínas del SARS CoV-2<sup>13,16,23,97-101</sup>. En este trabajo se decidió emplear a la línea celular Expi293, la cual permite un crecimiento a una alta densidad de cultivo en suspensión, una fácil transfección, escalado sencillo, y producción de proteínas con modificaciones postraduccionales<sup>102</sup>. Por otra parte, estas células emplean el medio de cultivo sintético Expi, el cual es libre de SFB. Esto es importante ya que proteínas del SFB dificultan la purificación de las proteínas de interés. Por otra parte, en sistemas eucariontes como HEK se obtienen rendimientos de proteínas puras en el orden de microgramos. Con el sistema Expi, logramos obtener rendimientos en el orden de miligramos con una cantidad de cultivo celular relativamente pequeña<sup>102,103</sup>. Este dato fue evidente para la proteína N. Ya que pudimos observar la presencia de esta proteína glicosilada y sin glicosilar.

El sistema de expresión Expi293 nos permitió obtener proteínas recombinantes que poseen regiones que se encuentran presentes en las proteínas nativas del SARS CoV-2. Lo anterior lo sugerimos con base en los resultados de WB donde se empleó suero de pacientes recuperados de COVID-19. Observamos que los anticuerpos presentes en el suero de estos individuos fueron capaces de reconocer a las 3 proteínas recombinantes. Esto indicó que las proteínas recombinantes poseen epítomos lineales que también se encuentran presentes en las proteínas nativas del virus.

Para determinar la inmunogenicidad de alguna proteína es necesario el uso de animales. Una gran cantidad de estudios preclínicos han evaluado la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes de S y el dominio RBD del SARS CoV-2. Sin embargo, pocos son los estudios que evalúan a la proteína N y menos aún, la combinación inmunogenicidad de más de un antígeno<sup>75,78</sup>.

Como se mencionó anteriormente, los modelos preclínicos más empleados para evaluar la inmunogenicidad de antígenos son los ratones, ya que no requieren de condiciones rigurosas para su manejo<sup>86</sup>. En este estudio se emplearon ratones BALB/c para evaluar de forma general la respuesta inmune inducida por las proteínas de interés. Sin embargo, ya que estos animales wildtype no son capaces de desarrollar una replicación viral adecuada, y debido a que no se infectaron con el SARS CoV-2, no se determinó si la inmunización con las proteínas recombinantes generadas permitiría la supervivencia de estos animales a una infección por el SARS CoV-2.

El empleo de un candidato vacunal distinto a la proteína Spike del SARS-CoV-2 es un tema poco explorado. De acuerdo a la OMS, a Julio de 2021 de 184 vacunas que se encuentran en ensayos preclínicos, únicamente 5 vacunas emplean a la proteína de nucleocápside como antígeno<sup>70,71</sup>. De estas, solo 3 proponen la combinación de la proteína N con la proteína Spike. Lo anterior con base en contar con un antígeno capaz de inducir anticuerpos neutralizantes (Spike) y un segundo antígeno (N) que confiera una inmunidad mediada por células T<sup>64,73,81,104</sup>. Otro punto importante para el empleo de la proteína de Nucleocápside es la hipótesis de qué este antígeno conferirá una inmunidad más duradera en comparación a la proteína S<sup>66</sup>. Lo anterior debido a que en SARS CoV se observó una respuesta de células T contra la proteína N 11 años posteriores a una primera infección<sup>66</sup>. Finalmente, la propuesta que la proteína N induce una respuesta inmune contra variantes del SARS CoV-2 y que esta protección es independiente a la neutralización<sup>75</sup>. Sin embargo, nosotros proponemos además que la proteína N permite la generación de una respuesta inmune más robusta.

De forma inicial logramos determinar que las 3 proteínas recombinantes son capaces de inducir una respuesta robusta de tanto de clase IgM como IgG. La hipótesis de que una inmunización combinada induciría una respuesta inmune más robusta la observamos en la respuesta de anticuerpos IgG. Se observó cierta tendencia de un aumento de anticuerpos IgG contra las proteínas RBD y S1 en

aquellos ratones inmunizados en combinación con la proteína N. Lo anterior contrasta con lo observado en un estudio desarrollado en 2006 por Deming y colaboradores. Este grupo inmunizan ratones con partículas virales (VRP) que expresaba de manera simultánea las proteínas S y N del SARS CoV. Este grupo no observa diferencias en los niveles de anticuerpos IgG contra la proteína S en aquellos ratones inmunizados con VRPs que expresan ambas proteínas del SARS CoV, en comparación con aquellas VRP que únicamente expresan la proteína S<sup>105</sup>.

Sin embargo, el hecho de que se tenga una respuesta de anticuerpos totales de clase IgM o IgG de estos anticuerpos solo una fracción de son capaces de tener actividad neutralizante. En la infección por SARS CoV-2 se ha descrito la importancia de los anticuerpos neutralizantes para la resolución de esta. El “estándar de oro” para determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos son los ensayos de neutralización en placa. Sin embargo, estos ensayos requieren el empleo de del virus activo. Debido a que muchos laboratorios no cuentan con las condiciones de bioseguridad adecuadas para el manejo del SARS CoV-2, se han desarrollado e implementado estrategias alternativas para evaluar la actividad neutralizante de los anticuerpos. Tales como el uso de pseudovirus que expresan la proteína Spike del SARS CoV-2 o ensayos de unión entre la proteína S o el dominio RBD con el receptor ACE2<sup>106</sup>. En este estudio empleamos un ensayo basado en la interacción del receptor ACE2 con la proteína RBD<sup>107</sup>.

De acuerdo a los resultados se observó actividad neutralizante en los sueros provenientes de ratones inmunizados con RBD, S1, así como en los grupos combinados RBD/N y S1/N.

Estudios en humanos reportan que gran parte de los anticuerpos neutralizantes contra el SARS CoV-2 se encuentran dirigidos contra el dominio RBD<sup>108</sup>. Lo anterior lo observamos en los sueros de ratones inmunizados con la proteína RBD, donde apreciamos un porcentaje de neutralización alrededor del 75%. Debido a que la proteína recombinante S1 contiene al dominio RBD, pudimos observar un

porcentaje de neutralización cercano también al 75%. Sin embargo, se han detectado anticuerpos con actividad neutralizante contra la región NTD de la proteína Spike. Se ha sugerido que regiones dentro del dominio NTD usan como receptores de anclaje a moléculas como DC-SIGN, L-SIGN y AXL<sup>44,45</sup> y que los anticuerpos neutralizantes contra la región NTD impiden este. Con estos datos se logró determinar que una inmunización individual con las proteínas recombinantes RBD y S1 del SARS CoV-2 induce anticuerpos neutralizantes.

Teniendo en consideración que la proteína N induce una respuesta de células T cooperadoras y que esta respuesta influye en la inmunidad humoral, se realizó una inmunización con la mezcla de las proteínas S1/N y RBD/N. Se observó actividad neutralizante en ambos grupos. De manera interesante los niveles de neutralización fueron mayores en aquellos grupos inmunizados con la mezcla de proteínas en comparación con aquellos inmunizados solo con una de ellas. Lo anterior lo atribuimos a la respuesta T cooperadora que induce la proteína N. La inmunización con más de un antígeno es algo que ha sido poco explorado. En 2020 el grupo de Rice y colaboradores emplea un vector adenoviral (Ad5) que expresa de forma simultánea la proteína S y un dominio de la proteína N para inmunizar ratones<sup>78</sup>. Este grupo observa la generación de anticuerpos IgG contra la proteína Spike del SARS CoV-2, sin embargo, únicamente observan un 40% de actividad neutralizante del total de anticuerpos. Por el contrario. La combinación tanto de las proteínas recombinantes RBD y S1 con la proteína N, están induciendo un porcentaje de neutralización cercano al 90%.

La propuesta de que una inmunización combinada con la proteína N induce una respuesta inmune más robusta está basada en el estímulo que esta proteína ejerce sobre las células T CD4+. Zhao y colaboradores observaron que una inmunización con un vector viral que expresa la proteína N del SARS CoV inducía en ratones la producción de células T CD4 productoras de Interferón- $\gamma$ . Y además que estas células CD4+ brindaban protección a estos animales ante un reto con el SARS CoV<sup>73</sup>. En 2020, el grupo de Zhuang y colaboradores inmunizó ratones que

expresaban el receptor ACE-2 humano con un vector viral con la proteína N del SARS CoV-2. Observaron también la inducción de células T productoras de IFN- $\gamma$  y una supervivencia de los animales tras un reto con el SARS CoV-2<sup>81</sup>.

Observamos la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a las 3 proteínas, sin embargo, los niveles fueron mayores en respuesta a la proteína N, sobre todo en los grupos inmunizados con la combinación de S1/N y RBD/N. El IFN- $\gamma$  es una citocina involucrada en el proceso de cambio de isotipo de los anticuerpos IgM a IgG y el proceso de maduración de la afinidad. Pensamos que la actividad de esta citocina está relacionada con los niveles mayores de anticuerpos IgG encontrados en los grupos de ratones inmunizados con la mezcla de proteínas. Por otra parte, la IL-2 una citocina importante en la maduración y supervivencia de los linfocitos B. Observamos mayores de IL-2 en aquellos grupos inmunizados de forma combinada y sugerimos que esta citocina está influyendo también en los niveles mayores de anticuerpos detectados en los grupos inmunizados de forma combinada.

Como se mencionó anteriormente, no fue posible determinar si la inmunización con las proteínas recombinantes permitiría a los animales sobrevivir a una infección por el SARS CoV-2. Sin embargo, en nuestros ensayos de inmunofluorescencia logramos determinar que los anticuerpos inducidos por proteínas recombinantes son capaces de reconocer al virus en su forma nativa durante el proceso de infección y de replicación del virus en la célula huésped. Por lo que el empleo de estos antígenos para una evaluación en humanos, induciría también anticuerpos capaces de reconocer a un SARS CoV-2 wild-type.

## **Conclusión**

Las proteínas recombinantes N, S1 y RBD del SARS CoV-2 generadas son capaces de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular en ratones BALB/c. La combinación de las proteínas RBD/N y S1/N induce una mayor respuesta de anticuerpos IgG y actividad neutralizante. Esta respuesta se atribuye a las citocinas generadas en respuesta a la proteína N.

## Referencias.

1. Park, S. E. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and Experimental Pediatrics* **63**, 119 (2020).
2. Ksiazek, T. G. *et al.* A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine* **348**, 1953–1966 (2003).
3. WHO | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *WHO* (2020).
4. COVID-19 Corona Tracker. <https://www.coronatracker.com/>.
5. Triggie, C. R. *et al.* A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. *Frontiers in Immunology* **12**, 631139 (2021).
6. L, J. *et al.* The close relationship between sudden loss of smell and COVID-19. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* **86**, 632–638 (2020).
7. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* vol. 92 418–423 (2020).
8. Chan, J. F.-W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections* **9**, 221 (2020).
9. Satarker, S. & Nampoothiri, M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research* (2020) doi:10.1016/j.arcmed.2020.05.012.
10. Yoshimoto, F. K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein Journal* vol. 39 198–216 (2020).
11. Coutard, B. *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research* **176**, (2020).
12. Lan, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **581**, 215–220 (2020).
13. Cai, Y. *et al.* Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* **369**, (2020).

14. Walls, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).
15. Zhou, T. *et al.* Cryo-EM Structures of SARS-CoV-2 Spike without and with ACE2 Reveal a pH-Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. *Cell Host and Microbe* **28**, 867-879.e5 (2020).
16. Fan, X., Cao, D., Kong, L. & Zhang, X. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. *Nature Communications* **11**, 1–10 (2020).
17. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S. & Crispin, M. Site-specific analysis of the SARS-CoV-2 glycan shield. *bioRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.03.26.010322.
18. Zeng, W. *et al.* Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **527**, 618–623 (2020).
19. Kang, S. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10**, 1228–1238 (2020).
20. Peng, Y. *et al.* Structures of the SARS -CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design . *The EMBO Journal* **39**, (2020).
21. Azad, G. K. Identification and molecular characterization of mutations in nucleocapsid phosphoprotein of SARS-CoV-2. *PeerJ* **9**, (2021).
22. CY, L., TL, T., CN, L., CH, L. & HY, W. Interaction of coronavirus nucleocapsid protein with the 5'- and 3'-ends of the coronavirus genome is involved in genome circularization and negative-strand RNA synthesis. *The FEBS journal* **286**, 3222–3239 (2019).
23. Rump, A. *et al.* Dual ELISA using SARS-CoV-2 nucleocapsid protein produced in E. coli and CHO cells reveals epitope masking by N-glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **534**, 457–460 (2021).
24. Thoms, M. *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. <http://science.sciencemag.org/>.
25. Xia, H. *et al.* Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Reports* **33**, 108234 (2020).
26. Huang, C. *et al.* SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: Viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathogens* **7**, 1002433 (2011).
27. Cornillez-Ty, C. T., Liao, L., Yates, J. R., Kuhn, P. & Buchmeier, M. J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein 2 Interacts

- with a Host Protein Complex Involved in Mitochondrial Biogenesis and Intracellular Signaling. *Journal of Virology* **83**, 10314–10318 (2009).
28. Frick, D. N., Viridi, R. S., Vuksanovic, N., Dahal, N. & Silvaggi, N. R. Molecular Basis for ADP-Ribose Binding to the Mac1 Domain of SARS-CoV-2 nsp3. *Biochemistry* **59**, 2608–2615 (2020).
  29. Angelini, M. M., Akhlaghpour, M., Neuman, B. W. & Buchmeier, M. J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio* **4**, (2013).
  30. Zhang, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. <http://science.sciencemag.org/>.
  31. Peng, Q. *et al.* Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2. *Cell Reports* **31**, 107774 (2020).
  32. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3287201/>.
  33. Wang, Y. *et al.* Coronavirus nsp10/nsp16 Methyltransferase Can Be Targeted by nsp10-Derived Peptide In Vitro and In Vivo To Reduce Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology* **89**, 8416–8427 (2015).
  34. Case, J. B., Ashbrook, A. W., Dermody, T. S. & Denison, M. R. Mutagenesis of S-Adenosyl-L-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7-Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity. *Journal of Virology* **90**, 7248–7256 (2016).
  35. Yuen, C.-K. *et al.* SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. (2020) doi:10.1080/22221751.2020.1780953.
  36. Gordon, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**, 459–468 (2020).
  37. Kim, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**, 914–921.e10 (2020).
  38. Ren, Y. *et al.* The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 17 881–883 (2020).
  39. Miorin, L. *et al.* SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 28344–28354 (2020).

40. Nizamudeen, Z. A. *et al.* Structural assessment of SARS-CoV2 accessory protein ORF7a predicts LFA-1 and Mac-1 binding potential. *Bioscience Reports* **41**, (2021).
41. Zhang, Y. *et al.* The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through potently downregulating MHC-I. *bioRxiv* 2020.05.24.111823 (2020) doi:10.1101/2020.05.24.111823.
42. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
43. Li, M. Y., Li, L., Zhang, Y. & Wang, X. S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty* **9**, 45 (2020).
44. Amraie, R. *et al.* CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2 and are differentially expressed in lung and kidney epithelial and endothelial cells. *bioRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.06.22.165803.
45. S, W. *et al.* AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell research* **31**, 126–140 (2021).
46. Lei, J., Kusov, Y. & Hilgenfeld, R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Research* vol. 149 58–74 (2018).
47. EJ, S., E, D. & J, Z. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Advances in virus research* **96**, 59–126 (2016).
48. Finkel, Y. *et al.* The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature* 2020 589:7840 **589**, 125–130 (2020).
49. Hartenian, E. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of Biological Chemistry* **295**, 12910 (2020).
50. G, L. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology* **92**, 424–432 (2020).
51. K, V. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International immunopharmacology* **59**, 391–412 (2018).
52. Rehwinkel, J. & Gack, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology* 2020 20:9 **20**, 537–551 (2020).
53. Tatura, A. L. & Baric, R. S. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Current Opinion in Virology* **2**, 264 (2012).

54. Molaei, S., Dadkhah, M., Asghariazar, V., Karami, C. & Safarzadeh, E. The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. *International Immunopharmacology* **92**, 107051 (2021).
55. E, P., C, K. & T, P. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific journal of allergy and immunology* **38**, 1–9 (2020).
56. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology* vol. 20 363–374 (2020).
57. Chen, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 2620–2629 (2020).
58. Xu, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine* **8**, 420–422 (2020).
59. Long, Q. X. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine* **26**, 845–848 (2020).
60. WC, C., W, L., PH, Z., F, Z. & JH, R. Disappearance of antibodies to SARS-associated coronavirus after recovery. *The New England journal of medicine* **357**, 1162–1163 (2007).
61. Hsueh, P. R., Huang, L. M., Chen, P. J., Kao, C. L. & Yang, P. C. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 1062–1066 (2004).
62. Long, Q. X. *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine* 1–5 (2020) doi:10.1038/s41591-020-0965-6.
63. Gallais, F. *et al.* Intrafamilial Exposure to SARS-CoV-2 Induces Cellular Immune Response without Seroconversion. *medRxiv* 2020.06.21.20132449 (2020) doi:10.1101/2020.06.21.20132449.
64. Thieme, C. *et al.* The SARS-COV-2 T-Cell Immunity is Directed Against the Spike, Membrane, and Nucleocapsid Protein and Associated with COVID 19 Severity. *SSRN Electronic Journal* 2020.05.13.20100636 (2020) doi:10.1101/2020.05.13.20100636.
65. Grifoni, A. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* **181**, 1489 (2020).

66. Ng, O. W. *et al.* Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine* **34**, 2008–2014 (2016).
67. Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **2020** 586:7830 **586**, 516–527 (2020).
68. Lin, J.-T. *et al.* Safety and immunogenicity from a Phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. (1359).
69. Modjarrad, K. *et al.* Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *The Lancet Infectious Diseases* **19**, 1013–1022 (2019).
70. COVID-19 vaccine tracker and landscape.  
<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
71. Covid-19 Vaccine Tracker: Latest Updates - The New York Times.  
<https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html>.
72. J, P., WH, C. & U, S. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced drug delivery reviews* **170**, 71–82 (2021).
73. Zhao, J. *et al.* Airway Memory CD4+ T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses. *Immunity* **44**, 1379–1391 (2016).
74. McCallum, M. *et al.* SARS-CoV-2 immune evasion by the B.1.427/B.1.429 variant of concern. *Science* (2021) doi:10.1126/SCIENCE.ABI7994.
75. Matchett, W. E. *et al.* Nucleocapsid vaccine elicits spike-independent SARS-CoV-2 protective immunity. *bioRxiv* (2021) doi:10.1101/2021.04.26.441518.
76. Chiappesi, F. *et al.* Development of a multi-antigenic SARS-CoV-2 vaccine candidate using a synthetic poxvirus platform. *Nature Communications* **11**, (2020).
77. Guirakhoo, F. *et al.* A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an Adeno Associated Virus Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (AAV hACE2) Mouse Model. *bioRxiv* 2020.11.30.399154 (2020) doi:10.1101/2020.11.30.399154.
78. Rice, A. *et al.* A Next Generation Bivalent Human Ad5 COVID-19 Vaccine Delivering Both Spike and Nucleocapsid Antigens Elicits Th1 Dominant CD4+, CD8+ T-cell and Neutralizing Antibody Responses. *bioRxiv* 2020.07.29.227595 (2020) doi:10.1101/2020.07.29.227595.

79. F, A. *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature medicine* **26**, 1033–1036 (2020).
80. KT, A. *et al.* A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. *JCI insight* **5**, (2020).
81. Z, Z. *et al.* Mapping and role of T cell response in SARS-CoV-2-infected mice. *The Journal of experimental medicine* **218**, (2021).
82. SI, M. *et al.* COVID-19: breaking down a global health crisis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **20**, (2021).
83. Ozili, P. K. & Arun, T. Spillover of COVID-19: Impact on the Global Economy. *SSRN Electronic Journal* (2020) doi:10.2139/SSRN.3562570.
84. Pollet, J., Chen, W. H. & Strych, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **170**, 71–82 (2021).
85. Kumar, S., Yadav, P. K., Srinivasan, R. & Perumal, N. Selection of animal models for COVID-19 research. *VirusDisease* *2020* **31**:4 **31**, 453–458 (2020).
86. K, J., O, A., S, S. & DR, W. Animal models for SARS-Cov2/Covid19 research-A commentary. *Biochemical pharmacology* **188**, (2021).
87. Johansen, M. D. *et al.* Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunology* *2020* **13**:6 **13**, 877–891 (2020).
88. Sun, J. *et al.* Generation of a Broadly Useful Model for COVID-19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment. *Cell* **182**, 734-743.e5 (2020).
89. Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* *2020* **583**:7818 **583**, 834–838 (2020).
90. Kim, Y.-I. *et al.* Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe* **27**, 704 (2020).
91. Lu, S. *et al.* Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2020* **5**:1 **5**, 1–9 (2020).
92. COVID-19 Corona Tracker. <https://www.coronatracker.com/>.
93. Hotez, P. J. & Bottazzi, M. E. Developing a low-cost and accessible COVID-19 vaccine for global health. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **14**, 1–6 (2020).
94. Gupta, S. K. & Shukla, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264> **36**, 1089–1098 (2015).

95. Ou, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* **11**, (2020).
96. Smith, C. C. *et al.* Landscape and selection of vaccine epitopes in SARS-CoV-2. *Genome Medicine* **13**, (2021).
97. Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *bioRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.02.11.944462.
98. Liang, J. G. *et al.* S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nature Communications* **2021 12:1 12**, 1–12 (2021).
99. E, F. *et al.* Induction of SARS-CoV-2 Protein S-Specific CD8+ T Cells in the Lungs of gp96-Ig-S Vaccinated Mice. *Frontiers in immunology* **11**, (2021).
100. SK, M. *et al.* Design of a highly thermotolerant, immunogenic SARS-CoV-2 spike fragment. *The Journal of biological chemistry* **296**, (2021).
101. M, S. *et al.* Rapid, high-yield production of full-length SARS-CoV-2 spike ectodomain by transient gene expression in CHO cells. *Journal of biotechnology* **326**, 21–27 (2021).
102. Krasnoselska, G. O. *et al.* Transient Transfection and Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in Expi293F Cells and Their Screening on a Small Scale: Application for Structural Studies. *Methods in Molecular Biology* **2305**, 105–128 (2021).
103. S, E. & M, M. Mammalian cell line developments in speed and efficiency. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **139**, 11–33 (2014).
104. Altmann, D. M. & Boyton, R. J. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Science immunology* **5**, 6160 (2020).
105. D, D. *et al.* Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS medicine* **3**, 2359–2375 (2006).
106. J, N. *et al.* Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections* **9**, 680–686 (2020).
107. Tan, C. W. *et al.* A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology* **2020 38:9 38**, 1073–1078 (2020).
108. Garcia-Beltran, W. F. *et al.* COVID-19 neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *medRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.10.15.20213512.