



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



*TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PEDECIBA BIOLOGÍA*

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE  
LA RESPUESTA HUMORAL Y SU ACTIVIDAD  
NEUTRALIZANTE FRENTE A VARIANTES DE SARS-CoV-2**

---

***Estudiante***

*MSc. Federico Carrión*

***Orientadores***

*PhD. Otto Pritsch*

*PhD. Sergio Bianchi*

LABORATORIO DE INMUNOVIROLOGÍA - INSTITUT PASTEUR DE MONTEVIDEO

---

*A Otto,  
siempre presente a pesar de la ausencia física*

# ÍNDICE

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE .....                                                                                                                         | 2  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                                                              | 6  |
| RESUMEN .....                                                                                                                        | 7  |
| ESTRUCTURA DE LA TESIS .....                                                                                                         | 9  |
| <b>CAPÍTULO 1: CO-EVOLUCION DE LAS ESTRATEGIAS DE CONTROL DEL SARS-CoV-2 Y LA PANDEMIA ..10</b>                                      |    |
| 1.1. ASPECTOS GENERALES.....                                                                                                         | 10 |
| 1.1.1. SARS-CoV-2 Y COVID-19 .....                                                                                                   | 10 |
| 1.1.2. EL CICLO VIRAL Y LOS POTENCIALES PUNTOS DE CONTROL DE LA INFECCIÓN .....                                                      | 11 |
| 1.1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ANTIGÉNICO .....                                                                                      | 13 |
| 1.1.4. DIAGNOSTICO SEROLÓGICO Y VACUNAS .....                                                                                        | 14 |
| 1.2. PROBLEMA Y OBJETIVOS .....                                                                                                      | 16 |
| 1.2.1. OBJETIVO GENERAL.....                                                                                                         | 17 |
| 1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....                                                                                                    | 17 |
| <b>CAPÍTULO 2: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA INTERFASE VIRUS-CÉLULA .....18</b>                                                      |    |
| 2.1. INTRODUCCION .....                                                                                                              | 18 |
| 2.1.1. GLICOPROTEINA SPIKE Y SU IMPLICANCIA EN EL MECANISMO DE INFECCIÓN .....                                                       | 18 |
| 2.1.2. EL RECEPTOR CELULAR ACE2.....                                                                                                 | 21 |
| 2.1.3. INTERACCIÓN ENTRE RBD Y ACE2 .....                                                                                            | 22 |
| 2.1.4. PRODUCCION DE GLICOPROTEÍNAS VIRALES EN FORMA RECOMBINANTE .....                                                              | 23 |
| 2.2. OBJETIVO ESPECIFICO 1 .....                                                                                                     | 26 |
| 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                                     | 27 |
| 2.3.1. OBTENCIÓN DE RBD Y shACE2 A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE S2.....                                                     | 27 |
| 2.3.2. LA REMOCIÓN DEL STREP-TAG NO COMPROMETE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS. ....                                     | 28 |
| 2.3.3. LAS PROPIEDADES DE INTERACCIÓN ENTRE RBD Y shACE2 SE ASEMEJAN A LAS DE SUS CONTRAPARTES NATURALES.....                        | 30 |
| 2.3.4. EL RBD PRODUCIDO EN S2 PRESENTA MICRO-HETEROGENEIDAD ASOCIADA PRINCIPALMENTE A PRESENCIA DE GLICANOS Y CARGAS NEGATIVAS ..... | 33 |
| 2.3.5. LA MICRO-HETEROGENEIDAD DEL RBD NO AFECTA SU FUNCIONALIDAD IN VITRO.....                                                      | 38 |
| 2.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....                                                                                                | 42 |
| 2.5. METODOLOGÍA .....                                                                                                               | 44 |
| 2.5.1. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS.....                                                                                               | 44 |
| 2.5.2. PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....                                                                                    | 44 |
| 2.5.3. ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO.....                                                                                              | 45 |

|                                                                                                                            |                                                                                                                         |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.3.1.                                                                                                                   | ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT .....                                                                                     | 45        |
| 2.5.3.2.                                                                                                                   | CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR .....                                                                              | 45        |
| 2.5.3.3.                                                                                                                   | DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ .....                                                                                        | 45        |
| 2.5.4.                                                                                                                     | ANÁLISIS DE TERMOESTABILIDAD .....                                                                                      | 45        |
| 2.5.5.                                                                                                                     | N-DEGLICOSILACIÓN .....                                                                                                 | 45        |
| 2.5.6.                                                                                                                     | CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (IEX) .....                                                                         | 45        |
| 2.5.7.                                                                                                                     | ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS) .....                                                                         | 46        |
| 2.5.7.1.                                                                                                                   | PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....                                                                                       | 46        |
| 2.5.7.2.                                                                                                                   | MALDI-TOF/TOF .....                                                                                                     | 46        |
| 2.5.7.3.                                                                                                                   | ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS) .....                                   | 46        |
| 2.5.8.                                                                                                                     | CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA .....                                                                             | 47        |
| 2.5.9.                                                                                                                     | RESONANCIA DE PLASMÓNICA DE SUPERFICIE .....                                                                            | 47        |
| 2.5.10.                                                                                                                    | ENSAYO DE UNIÓN A LA SUPERFICIE CELULAR .....                                                                           | 47        |
| 2.5.11.                                                                                                                    | ELISA .....                                                                                                             | 48        |
| <b>CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A VACUNACIÓN HETERÓLOGAS .....</b>                                   |                                                                                                                         | <b>49</b> |
| 3.1.                                                                                                                       | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                      | 49        |
| 3.1.1.                                                                                                                     | RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL .....                                                                                        | 49        |
| 3.1.1.1.                                                                                                                   | RESPUESTA INNATA .....                                                                                                  | 49        |
| 3.1.1.2.                                                                                                                   | RESPUESTA ADAPTATIVA .....                                                                                              | 50        |
| 3.1.1.3.                                                                                                                   | INMUNIDAD Y PROTECCIÓN .....                                                                                            | 54        |
| 3.1.2.                                                                                                                     | VACUNAS CONTRA SARS-CoV-2 .....                                                                                         | 55        |
| 3.1.2.1.                                                                                                                   | LA VACUNACIÓN EN URUGUAY .....                                                                                          | 57        |
| 3.2.                                                                                                                       | OBJETIVO ESPECÍFICO 2 .....                                                                                             | 58        |
| 3.3.                                                                                                                       | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                                            | 59        |
| 3.3.1.                                                                                                                     | LA TERCERA DOSIS HETERÓLOGA RECUPERA LOS NIVELES DE IgG ESPECÍFICAS CONTRA SARS-COV-2 .....                             | 59        |
| 3.3.2.                                                                                                                     | LA TERCERA DOSIS HETERÓLOGA IMPLICA TAMBIÉN UN AUMENTO DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE Y DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ..... | 60        |
| 3.3.3.                                                                                                                     | LA TERCERA DOSIS HETERÓLOGA IMPLICA TAMBIÉN AUMENTO DE LAS RESPUESTAS EFECTORAS MEDIADAS POR ANTICUERPOS .....          | 64        |
| 3.4.                                                                                                                       | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....                                                                                       | 68        |
| 3.5.                                                                                                                       | METODOLOGÍA .....                                                                                                       | 69        |
| 3.5.1.                                                                                                                     | DATOS DE LA COHORTE Y DISEÑO DEL ESTUDIO .....                                                                          | 69        |
| 3.5.2.                                                                                                                     | ELISA CUANTITATIVO .....                                                                                                | 69        |
| 3.5.3.                                                                                                                     | ENSAYO ALTERNATIVO DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL (sVNT) .....                                                                 | 69        |
| 3.5.4.                                                                                                                     | RESONANCIA PLASMONICA DE SUPERFICIE (SPR) .....                                                                         | 70        |
| 3.5.5.                                                                                                                     | ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y FAGOCITOSIS CELULAR DEPENDIENTES DE ANTICUERPOS (ADCC Y ADCP) .....                          | 70        |
| 3.5.6.                                                                                                                     | ANÁLISIS DE DATOS .....                                                                                                 | 71        |
| <b>CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE ENSAYOS ALTERNATIVOS DE NEUTRALIZACIÓN PARA VARIANTES DE PREOCUPACIÓN DE SARS-CoV-2 .....</b> |                                                                                                                         | <b>72</b> |
| 4.1.                                                                                                                       | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                      | 72        |
| 4.1.1.                                                                                                                     | ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES .....                                                                                        | 72        |
| 4.1.2.                                                                                                                     | ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL Y ALTERNATIVAS .....                                                                    | 74        |

|                                                                                                                 |                                                                                                                                               |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.3.                                                                                                          | NUEVAS VARIANTES EMERGENTES .....                                                                                                             | 76         |
| 4.2.                                                                                                            | OBJETIVO ESPECÍFICO 3 .....                                                                                                                   | 79         |
| 4.3.                                                                                                            | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                                                   | 80         |
| 4.3.1.                                                                                                          | PRODUCCIÓN DE RBDs DE MÚLTIPLES VARIANTES DE SARS-COV-2 EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA .....                                                     | 80         |
| 4.3.2.                                                                                                          | ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN CON shACE2 DEMUESTRAN LA FUNCIONALIDAD DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE RBD PRODUCIDAS EN CÉLULAS S2 ..... | 84         |
| 4.3.3.                                                                                                          | EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE UNIÓN DE LAS VARIANTES DE RBD A SHACE2.....                                                    | 88         |
| 4.3.4.                                                                                                          | LA MENOR TERMOESTABILIDAD DE <sup>Omicron</sup> RBD CONDICIONA EL DISEÑO DE LOS sVNTs.....                                                    | 89         |
| 4.3.5.                                                                                                          | OPTIMIZACIÓN DE UN ELISA DE COMPETICIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE SUEROS HUMANOS EN FORMA ALTERNATIVA (SVNT). .....          | 92         |
| 4.4.                                                                                                            | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....                                                                                                              | 95         |
| 4.5.                                                                                                            | METODOLOGÍA .....                                                                                                                             | 96         |
| 4.5.1.                                                                                                          | CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS.....                                                                                                               | 96         |
| 4.5.2.                                                                                                          | PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....                                                                                                    | 96         |
| 4.5.3.                                                                                                          | ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO DE LAS PROTEÍNAS .....                                                                                            | 97         |
| 4.5.4.                                                                                                          | ANALISIS DE TERMOESTABILIDAD .....                                                                                                            | 97         |
| 4.5.5.                                                                                                          | DICROÍSMO CIRCULAR (CD).....                                                                                                                  | 97         |
| 4.5.6.                                                                                                          | RESONANCIA PLASMONICA DE SUPERFICIE (SPR) .....                                                                                               | 98         |
| 4.5.7.                                                                                                          | ELISA.....                                                                                                                                    | 98         |
| <b>CAPÍTULO 5: ANTICUERPOS BOVINOS CON CDRH3 ULTRA-LARGOS CAPACES DE BLOQUEAR LA INTERACCIÓN RBD:ACE2 .....</b> |                                                                                                                                               | <b>100</b> |
| 5.1.                                                                                                            | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                            | 100        |
| 5.1.1.                                                                                                          | ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE AMPLIO ESPECTRO (bNAbs).....                                                                                    | 100        |
| 5.1.2.                                                                                                          | ANTICUERPOS BOVINOS CON CDR3 DE CADENA PESADA ULTRA LARGOS (UL-CDRH3) .....                                                                   | 100        |
| 5.1.3.                                                                                                          | TERAPIAS DE INMUNIZACION PASIVA BASADAS EN VACAS HIPERINMUNES CONTRA SARS-CoV-2 .....                                                         | 102        |
| 5.2.                                                                                                            | OBJETIVO ESPECÍFICO 4 .....                                                                                                                   | 103        |
| 5.3.                                                                                                            | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                                                   | 104        |
| 5.3.1.                                                                                                          | PRODUCCIÓN DE UN NANOBODY ANTI-RBD FUSIONADO A scFc EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA.....                                                          | 104        |
| 5.3.2.                                                                                                          | PRODUCCIÓN DEL ECTODOMINIO DE SPIKE EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA .....                                                                         | 106        |
| 5.3.3.                                                                                                          | INMUNIZACIÓN DE VACAS CON EL ECTODOMINIO DE SPIKE Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL. ...                                                     | 109        |
| 5.3.4.                                                                                                          | PRUEBA DE CONCEPTO: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN DOMINIO DE ANTICUERPO CON UL-CDRH3 EN CÉLULAS S2.....                                  | 112        |
| 5.4.                                                                                                            | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....                                                                                                              | 116        |
| 5.5.                                                                                                            | METODOLOGÍA .....                                                                                                                             | 117        |
| 5.5.1.                                                                                                          | CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS.....                                                                                                               | 117        |
| 5.5.2.                                                                                                          | PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....                                                                                                    | 117        |
| 5.5.3.                                                                                                          | ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO.....                                                                                                              | 118        |
| 5.5.3.1.                                                                                                        | ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT .....                                                                                                           | 118        |
| 5.5.3.2.                                                                                                        | DISPERSION DINÁMICA DE LUZ.....                                                                                                               | 118        |

|                                                                                                      |                                                                   |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5.4.                                                                                               | ANÁLISIS DE TERMOESTABILIDAD .....                                | 118 |
| 5.5.5.                                                                                               | ANÁLISIS CUALITATIVO DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS .....         | 119 |
| 5.5.5.1.                                                                                             | RESONANCIA DE PLASMÓNICA DE SUPERFICIE.....                       | 119 |
| 5.5.5.2.                                                                                             | CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR ANALÍTICA .....              | 119 |
| 5.5.6.                                                                                               | INMUNIZACIÓN DE VACAS .....                                       | 119 |
| 5.5.7.                                                                                               | TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG BOVINOS ESPECÍFICOS POR ELISA ..... | 120 |
| 5.5.8.                                                                                               | ENSAYOS ALTERNATIVOS DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL (sVNT).....          | 121 |
| BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....                                                                            |                                                                   | 122 |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                                                 |                                                                   | 156 |
| ANEXO .....                                                                                          |                                                                   | 158 |
| 1.                                                                                                   | TABLAS SUPLEMENTARIAS.....                                        | 158 |
| 2.                                                                                                   | ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO PRIMER AUTOR.....                       | 172 |
|                                                                                                      | PUBLICACIÓN 1.....                                                | 172 |
|                                                                                                      | PUBLICACIÓN 2.....                                                | 184 |
| 3.                                                                                                   | INFORMES DEL DLSP PARA LOS KITS SEROLÓGICOS DESARROLLADOS .....   | 192 |
|                                                                                                      | INFORMES DLSP KIT “COVID-19 IgG ELISA UY 2.0” .....               | 192 |
|                                                                                                      | INFORME DLSP KIT “COVID-19 IgG QUANT ELISA” .....                 | 194 |
| REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DE VENTA DE KITS SEROLÓGICOS POR PARTE DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA ..... |                                                                   | 196 |
|                                                                                                      | REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DEL KIT “COVID-19 IgG ELISA UY 2.0” ..... | 196 |
|                                                                                                      | REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DEL KIT “COVID-19 IgG QUANT ELISA” .....  | 197 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Aspectos generales de SARS-CoV-2.....                                                                                                                            | 11  |
| Figura 2: Esquema de los dominios de la proteína S y su rol en los mecanismos de unión al receptor y fusión de membranas .....                                             | 20  |
| Figura 3: Interacción entre RBD y ACE2 .....                                                                                                                               | 23  |
| Figura 4: Expresión y purificación de las proteínas recombinantes RBD y shACE2 .....                                                                                       | 27  |
| Figura 5: Purificación de RBD-ST y shACE2-ST .....                                                                                                                         | 28  |
| Figura 6: Análisis de tamaños por cromatografía de exclusión molecular analítica.....                                                                                      | 28  |
| Figura 7: Optimización del protocolo de remoción del Strep-tag mediante tratamiento proteolítico con enterokinasa bovina (EK). .....                                       | 29  |
| Figura 8: Radio hidrodinámico de las proteínas recombinantes purificadas .....                                                                                             | 29  |
| Figura 9: Termoestabilidad de las proteínas recombinantes RBD y shACE2 .....                                                                                               | 30  |
| Figura 10: Análisis funcional de las proteínas recombinantes RBD y shACE2 .....                                                                                            | 31  |
| Figura 11: Microheterogeneidad de la RBD. ....                                                                                                                             | 33  |
| Figura 12: Identificación de péptidos por MALDI-TOF/TOF.....                                                                                                               | 34  |
| Figura 13: Micro-heterogeneidad de carga de RBD. ....                                                                                                                      | 35  |
| Figura 14: Efecto de la desamidación espontánea y aductos de Tris sobre la microheterogeneidad de las cargas negativas de RBD <sup>clv</sup> analizadas por LC-MS/MS ..... | 37  |
| Figura 15: Efecto de la N-glicosilación del RBD en la antigenicidad y su unión a shACE2. ....                                                                              | 39  |
| Figura 16: Efecto de la microheterogeneidad de las cargas negativas de RBD en la unión con shACE2 y la antigenicidad.. ....                                                | 40  |
| Figura 17: Respuesta adaptativa frente a SARS-CoV-2.....                                                                                                                   | 54  |
| Figura 18: Evolución de los niveles séricos de IgG anti RBD de SARS-CoV-2 a lo largo del estudio.....                                                                      | 59  |
| Figura 19: Evolución de la actividad neutralizante analizada con sVNT comerciales a lo largo del estudio.....                                                              | 61  |
| Figura 20: Análisis por SPR de las cinéticas de unión de los anticuerpos específicos totales. ....                                                                         | 63  |
| Figura 21: Evolución de los niveles de anticuerpos totales anti-RBD medidos por SPR.....                                                                                   | 64  |
| Figura 22: Funciones mediadas por Fc e inhibición de la unión RBD-ACE2 de inmunoglobulinas séricas anti-RBD específicas.. ....                                             | 65  |
| Figura 23: Evolución de la respuesta neutralizante frente a la variante Omicron.....                                                                                       | 66  |
| Figura 24: Epitopes de anticuerpos neutralizantes contra el RBD de SARS-CoV-2. ....                                                                                        | 73  |
| Figura 25: Sustituciones en el RBM de múltiples VOCs de SARS-CoV-2. ....                                                                                                   | 78  |
| Figura 26: Efecto de la sustitución C538T en la producción del RBD de SARS-CoV-2.....                                                                                      | 80  |
| Figura 27: Diagrama a escala de las construcciones diseñadas para producir los RBD de diferentes VOCs de SARS-CoV-2 en células S2.....                                     | 82  |
| Figura 28: Purificación de RBDs de SARS-CoV-2 pertenecientes a diferentes VOCs.....                                                                                        | 83  |
| Figura 29: Análisis cinético por SPR de la interacción a 25°C entre los RBDs de distintas variantes de SARS-CoV-2 y shACE2-ST.....                                         | 85  |
| Figura 30: : Análisis cinético por SPR y comparación de la interacción a 37°C entre los RBDs de distintas variantes de SARS-CoV-2 y shACE2-ST .....                        | 88  |
| Figura 31: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de <sup>Omicron</sup> RBD.....                                                                                    | 91  |
| Figura 32: Análisis de la capacidad de bloquear la interacción RBD-ACE2 en sueros humanos, mediante el uso de los sVNTs desarrollados “ <i>in house</i> ”. .....           | 94  |
| Figura 33: Anticuerpos bovinos con CDR3 ultra-largos.....                                                                                                                  | 102 |
| Figura 34: Producción de VHH-V/scFc en células de S2 de <i>Drosophila</i> . ....                                                                                           | 105 |
| Figura 35: Producción del ectodominio de la Spike de SARS-CoV-2 (ectoS) en células S2 de <i>Drosophila</i> . ....                                                          | 107 |
| Figura 36: Inmunización de vacas con el ectodominio monomérico de la Spike de SARS-CoV-2 (ectoS) y análisis de respuesta. ....                                             | 111 |
| Figura 37: Producción y caracterización de un scFv con UL-CDR3 específico en células S2.....                                                                               | 113 |

# RESUMEN

---

La pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, ha generado numerosos impactos, tanto sanitarios, como económicos y sociales. El rápido desarrollo e implementación de vacunas mostró ser sumamente efectivo para combatir las formas graves de la enfermedad y disminuir las muertes asociadas a la misma. La generación de anticuerpos neutralizantes, capaces de impedir la entrada del virus a las células, surge como un mecanismo inmunológico clave de la protección inducida por las vacunas. Sin embargo, la aparición de nuevas variantes virales mejor adaptadas, disparó la necesidad de entender de qué manera son capaces de transmitirse más eficientemente y de escapar a los mecanismos de defensa inmunológica. Incluso, la pérdida de eficacia de las vacunas frente a estas nuevas variantes ha requerido que su diseño haya sido adaptado, administrándose nuevas dosis basadas en algunas de estas variantes virales.

Este trabajo de tesis tiene por objetivo principal el desarrollo de estrategias alternativas para analizar *in vitro* la neutralización por anticuerpos frente a diversas variantes de SARS-CoV-2 y evaluar herramientas novedosas con capacidad de bloquear dicha interacción.

Para ello, se produjeron en forma recombinante dominios solubles de la glicoproteína de superficie de SARS-CoV-2 pertenecientes a diversas variantes virales, así como de la glicoproteína humana hACE2 que actúa como receptor celular del virus. Se llevó a cabo una profunda caracterización biofísica y bioquímica de las proteínas obtenidas y de su interacción *in vitro*, lo que permitió desarrollar múltiples ensayos serológicos cualitativos y cuantitativos, para evaluar la respuesta humoral por anticuerpos. La utilización de dichos ensayos para estudiar la respuesta frente a diversas variantes virales en individuos vacunados se presenta como parte de los resultados de esta tesis, demostrando su utilidad para estudiar la eficacia de vacunas, pero también como una herramienta para la búsqueda de inhibidores virales a SARS-CoV-2 (pequeñas moléculas, dominios de anticuerpos, etc).

En este sentido, los anticuerpos bovinos con CDR3 ultra-largos vienen siendo estudiados como una alternativa novedosa para unir epítopes de proteínas virales de superficie poco accesibles, generando anticuerpos ampliamente neutralizantes. En esta línea, se inmunizaron vacas con la proteína Spike recombinante de SARS-CoV-2, y se evaluó la respuesta humoral frente a las mismas dando origen a una colección de sueros reactivos y células B capaces de expresar este tipo de anticuerpos. Como prueba de concepto, un dominio de anticuerpo con CDR3 ultra-largo se purificó en células de insecto, demostrándose

---

su capacidad para reconocer con alta afinidad el RBD de la proteína de SARS-CoV-2. Estos resultados sugieren que este tipo de estrategias tiene gran potencial para generar “*binders*” contra proteínas de diversos virus, y que pueden ser obtenidos utilizando un sistema de expresión en células de insecto.

---

# ESTRUCTURA DE LA TESIS

---

Este breve prólogo pretende guiar a los lectores en la estructura que hemos definido para esta tesis. Pretende seguir un orden que consideramos el más lógico, teniendo en cuenta los objetivos planteados y la metodología elegida para alcanzarlos. El documento se encuentra dividido en 5 capítulos: el **capítulo 1** es de carácter introductorio, donde se presentan aspectos generales del trabajo que atraviesan transversalmente las temáticas abordadas en los demás capítulos, además de la problemática que se intentó resolver y los objetivos planteados; cada uno de los capítulos restantes (**capítulos 2 al 5**) está vinculado a uno de los objetivos específicos planteados en esta tesis y comparten una misma estructura.

Así, primero se presenta una introducción enfocada en la temática vinculada al capítulo, seguida del objetivo específico correspondiente. A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos, seguido de un breve resumen de las conclusiones y perspectivas que se desprenden de estos. Para cerrar cada capítulo, se presenta la metodología aplicada en el mismo.

Al final del documento se presenta la bibliografía consultada y un anexo conteniendo tablas suplementarias, las publicaciones de primera autoría que se desprenden de esta tesis, y los informes y registros expedidos por el Ministerio de Salud Pública para los kits serológicos desarrollados.

# CAPÍTULO 1: CO-EVOLUCION DE LAS ESTRATEGIAS DE CONTROL DEL SARS-CoV-2 Y LA PANDEMIA

## 1.1. ASPECTOS GENERALES

### 1.1.1. SARS-CoV-2 Y COVID-19

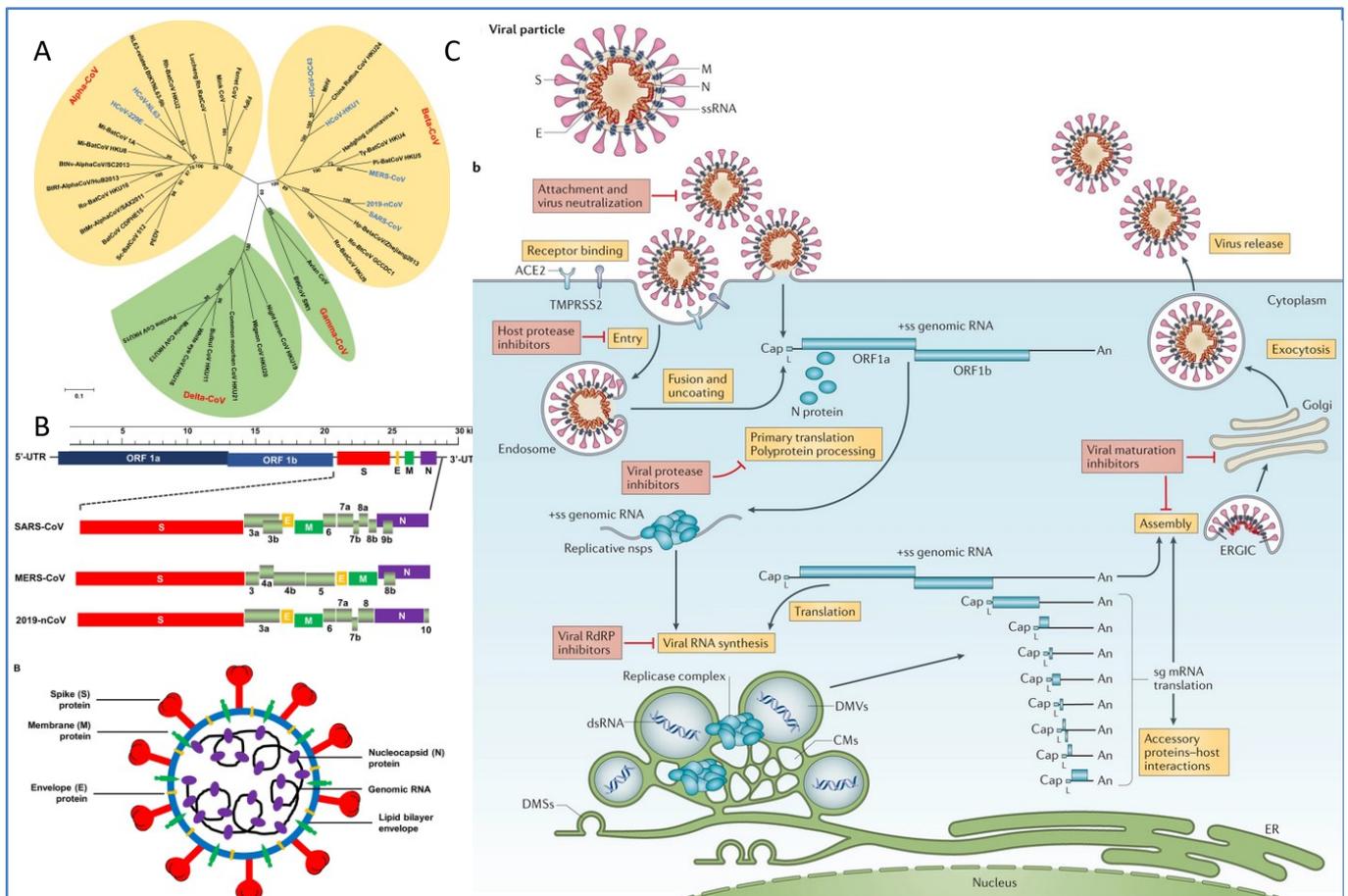
La COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) es una enfermedad descrita en China a finales de 2019 como un síndrome respiratorio severo acompañado de fiebre y neumonía, muchas veces con consecuencias fatales (Q. Li, 2020). Las manifestaciones clínicas de la infección van desde casos asintomáticos a pacientes con síntomas leves y graves. (X. Dong et al., 2020). Los casos graves se presentan principalmente como insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal, tromboembolias y otras complicaciones como neumonía severa, síndrome de “*distress*” respiratorio agudo (SDRA), trastornos de la coagulación, daño multiorgánico, complicaciones neurológicas, entre otros (C. Huang et al., 2020; Sokolowska et al., 2020).

El agente causante de dicha enfermedad es una variante hasta ese momento desconocida de coronavirus (World Health Organization, 2020c), que fue inicialmente descrito como 2019-nCoV (*2019 novel coronavirus*) y luego renombrado como SARS-CoV-2, por su similitud con el coronavirus causante del síndrome respiratorio severo agudo, descrito en 2002 como SARS-CoV (Gorbalenya et al., 2020). A pesar de las similitudes en la patología y sus síntomas, el secuenciado del genoma de SARS-CoV-2 permitió dilucidar una mayor homología de secuencia con un coronavirus de murciélago (Wu et al., 2020), lo que podría estar relacionado al origen zoonótico de este (Lundstrom et al., 2020; P. Zhou et al., 2020).

A diferencia del SARS-CoV, el SARS-CoV-2 presenta una altísima tasa de transmisión entre humanos, responsable de su rápida diseminación global que llevó a que la OMS declarara en menos de un mes el máximo nivel de alerta: Emergencia Sanitaria de Interés Internacional (World Health Organization, 2020b), y reconociera características de pandemia en menos de cuatro meses (World Health Organization, 2020a).

Actualmente se conocen siete coronavirus con capacidad de infectar humanos: dos pertenecientes al género *alfacoronavirus* (HCoV-NL63 y HCoV-229E) y cinco pertenecientes al de *betacoronavirus* (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2), siendo los últimos tres responsables de

infecciones severas en humanos (**Figura 1.A**). Estos son virus envueltos con un genoma ARN de cadena única y polaridad positiva, con una longitud de 27-32 kb y una organización genómica común (**Figura 1.B**). Aproximadamente los dos tercios de su genoma están ocupados por dos marcos de lectura abiertos superpuestos ORF1a y ORF1b que codifican las poliproteínas pp1a y pp1ab que son posteriormente clivadas por proteasas virales para dar origen a 15-16 proteínas no estructurales (*nsp*). El tercio restante de su genoma codifica las proteínas estructurales S (*spike*), E (envoltura) y M (de membrana) dispuestas en la superficie del virión, y la proteína N (nucleocápside) empaquetada con el ARN viral en el interior de la partícula (N. Wang et al., 2020). La proteína S o *spike* forma trímeros en la superficie del virus, los cuales protruyen hacia el exterior formando estructuras con forma de espículas que le dan su morfología característica.



**Figura 1: Aspectos generales de SARS-CoV-2. A) Organización filogenética de SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos. B) Organización genómica de los coronavirus humanos. C) Ciclo viral del SARS-CoV-2. Tomado de (V'kovski et al., 2020; N. Wang et al., 2020).**

### 1.1.2. EL CICLO VIRAL Y LOS POTENCIALES PUNTOS DE CONTROL DE LA INFECCIÓN.

Entender el ciclo viral nos permite identificar los pasos requeridos por el virus para completar la infección, lo cual resulta importante para buscar estrategias que impidan la transmisión del virus (**Figura 1.C**).

La proteína S tiene un rol clave en las primeras etapas del ciclo del virus ya que es la responsable de la **unión al receptor ACE2** expresado en la superficie de las células blanco y de la fusión de las membranas que dan lugar a la entrada del virión (descrito en detalle en la sección 2.1 del capítulo 2). Los anticuerpos neutralizantes (producidos durante la respuesta inmune adaptativa o administrados de forma terapéutica) son la principal herramienta para bloquear el ciclo en su etapa inicial (descrito en la sección 4.1.1). Dos estrategias terapéuticas de acción antiviral que actúan en esta etapa han recibido autorización de la FDA para su uso contra COVID-19 durante la emergencia sanitaria (EUA, por *emergency use authorization*): la transfusión de plasma convaleciente, y la administración de combinaciones de anticuerpos monoclonales (casirivimab, imdevimab, bamlanivimab y etesevimab), todos neutralizantes y reactivos contra el dominio de unión al receptor de la proteína S (National Institutes of Health, 2024). El uso de una versión soluble del receptor celular (ACE2) recombinante, como estrategia para competir e impedir la interacción de la proteína S con la célula también ha despertado particular interés y se han iniciado pruebas clínicas en este sentido (Amanat et al., 2020).

La entrada del virus en la célula se da mediante el acercamiento y **fusión** de las membranas del virus y la célula. Este proceso es también mediado por *spike*, la cual es clivada de manera específica por una proteasa celular de superficie (TMPRSS2), dando lugar a un re-arreglo conformacional que puede ser también impedido por la acción de anticuerpos neutralizantes. La inhibición de dicha proteasa celular también ha sido propuesta como un posible mecanismo de control de la entrada del virus (Hoffmann, Schroeder, et al., 2020) aunque su naturaleza no específica lo hace un blanco menos promisorio.

La liberación del ARN genómico del virus en el citoplasma de la célula infectada (**desnudamiento**), permite que las poliproteínas pp1a (codificada por el ORF1a) y pp1ab (originada por un corrimiento en el marco de lectura al final de ORF1a) sean traducidas de manera temprana por la maquinaria celular. La poliproteína pp1a contiene las cisteína-proteasas virales *3C-like proteinase* ( $3CL^{PRO}$ , *nsp5* también llamada  $M^{PRO}$  por ser la proteasa principal) y *papain-like proteinase* ( $PL^{PRO}$ , *nsp3*) que dan lugar a la proteólisis de estas (de manera co- y post-traducciona), produciendo 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) con importantes funciones en el ciclo viral y en la evasión de la respuesta antiviral. Ciertos inhibidores de proteasas (*lopinavir*, *ritonavir*) aprobados contra SARS, MERS o HIV forman parte de las estrategias de reposicionamiento de fármacos contra SARS-CoV-2 (Amanat et al., 2020; Esposito et al., 2020; Magro et al., 2020). El inhibidor de  $M^{PRO}$ , *nirmatrelvir* en combinación con *ritonavir* fue aprobado por la FDA para su uso en determinados pacientes (National Institutes of Health, 2024).

La **replicación del genoma** viral es llevada a cabo mediante síntesis de una cadena de ARN intermediario de polaridad negativa ( $ARN^-$ ) por parte de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp por *RNA*

*dependent RNA polymerase*, contenida en la *nsp12*). Dicho ARN<sup>-</sup> actúa como molde para la síntesis de cadenas de ARN<sup>+</sup> que serán empaquetados en la partícula viral como ARN genómico, o actuarán como mensajeros para la traducción de nuevas proteínas. Análogos de bases nitrogenadas como *remdesivir*, *ribavirin*, *favipiravir* y *umifenovir*, con capacidad de inhibir la síntesis de ARN y aprobados previamente para otras infecciones virales también han sido evaluados contra SARS-CoV-2. Hasta el momento, el único fármaco aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de la COVID-19 es el *remdesivir* (European Medicines Agency (EMA), 2021; National Institutes of Health, 2024; U.S. Food and Drug Administration, 2020).

La última etapa del ciclo corresponde a la traducción de las proteínas estructurales S, E, M y N de manera tardía, dando lugar al ensamblaje de los nuevos viriones para su egreso. La mayoría de los coronavirus se ensamblan en compartimientos del retículo endoplásmico y aparato de Golgi para egresar por exocitosis, sin embargo nuevas evidencias sugieren que la salida de los betacoronavirus podría ocurrir por la vía de tráfico lisosomal (Ghosh et al., 2020).

### 1.1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ANTIGÉNICO

La detección de ARN viral obtenido mediante hisopados del tracto respiratorio superior fue el primer método diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 en implementarse de manera exitosa, gracias al rápido secuenciado masivo del genoma viral (Wu et al., 2020), y es considerado el “*gold standard*” para diagnóstico de la enfermedad en su fase activa (Krammer & Simon, 2020; van Kasteren et al., 2020). La técnica utilizada para ello es la PCR cuantitativa acoplada a transcriptasa reversa (RT-qPCR), y diversos juegos de *primers* han sido diseñados para amplificar las secuencias de los genes E, RdRp y N (D’Cruz et al., 2020), entre otros.

Su demostrada eficacia en la detección del virus se ha visto contrarrestada por dificultades relacionadas con la correcta extracción de muestras, riesgos de bioseguridad para el personal encargado de la extracción y procesamiento, disponibilidad de insumos y disponibilidad de equipamiento (Tang et al., 2020). Por estos motivos, otras estrategias moleculares han sido desarrolladas como por ejemplo las basados en LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) y métodos basados en microarreglos (Ai et al., 2020; M. P. Cheng et al., 2020; Shen et al., 2020; Tang et al., 2020). De todos modos, los test moleculares basados en RT-qPCR son el *gold standard* para diagnosticar la infección por SARS-CoV-2.

A medida que fueron surgiendo anticuerpos monoclonales (mAbs) con capacidad para detectar proteínas de SARS-CoV-2 de manera específica, los **test de antígeno** (fundamentalmente bajo la forma de test rápidos en plataformas de cromatografía por flujo lateral) fueron surgiendo como una alternativa diagnóstica más económica, rápida y accesible. Si bien el inicio del periodo de aplicabilidad de los test de antígeno coincide con el de los test moleculares, su sensibilidad es notoriamente más baja y el periodo de tiempo de infección en el que son aplicables es más breve (M. P. Cheng et al., 2020; Guglielmi, 2020).

#### **1.1.4. DIAGNOSTICO SEROLÓGICO Y VACUNAS**

Numerosos ensayos serológicos (ELISA, flujo lateral y *Western blot*, entre otros) han sido desarrollados en las últimas décadas para detectar respuestas inmunes a patógenos. Las infecciones por SARS-CoV-2 no han sido la excepción, siendo los ensayos de tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) los más utilizados por su capacidad de automatización y la generación de resultados semicuantitativos que permiten validar su performance en términos de sensibilidad y especificidad (Krammer & Simon, 2020).

La generación de una respuesta adaptativa humoral permite determinar la presencia del virus en forma retrospectiva e indirecta, mediante la detección de anticuerpos específicos generados durante la infección. El carácter específico y la alta concentración de los anticuerpos séricos hacen que su presencia sea relativamente fácil de detectar y cuantificar, respecto a otros componentes de la respuesta inmune (descritos en detalle en la sección 3.1.1 del capítulo 3).

Los ensayos serológicos cuando son utilizados para diagnóstico detectan la presencia de anticuerpos séricos contra SARS-CoV-2 en lugar de detectar componentes del virus (como los test moleculares y antigénicos). El período de tiempo para aplicar estos ensayos es posterior al de los test descritos en la sección anterior (Escribano et al., 2020), dado que requieren que el individuo monte una respuesta inmune detectable (usualmente más de 10 días después de la aparición de síntomas si nos referimos por ejemplo a las IgGs). Esto hace que su uso en forma aislada resulte de poca eficacia para detectar casos activos de infección por SARS-CoV-2 y que su utilización para tales fines haya sido desaconsejada durante la pandemia. Sin embargo, su aplicación sinérgica con test moleculares ha potenciado las ventajas del otro método, permitiendo dimensionar de manera más exacta la cantidad real de casos y el impacto de las medidas adoptadas previo a la distribución de vacunas contra SARS-CoV-2 (Escribano et al., 2020). Además, los test serológicos representaron una herramienta de gran utilidad en la vigilancia sobre subpoblaciones de interés como por ejemplo trabajadores de la salud o grupos de riesgo, y han servido como técnica de diagnóstico retrospectivo de casos asintomáticos (Krammer & Simon, 2020).

Por otro lado, la transferencia de plasma de individuos recuperados con fines terapéuticos ha sido utilizada como mecanismo de inmunización pasiva y el uso de plasma con altos títulos de anticuerpos ha sido autorizado para tratar individuos inmunocomprometidos durante la emergencia sanitaria (National Institutes of Health, 2024). Teniendo en cuenta que existe una correlación entre el título de anticuerpos y la capacidad neutralizante (Amanat et al., 2020; Okba et al., 2020), la aplicación de test serológicos cuantitativos en pacientes recuperados ha sido de gran utilidad para de identificar aquellos donantes de plasma más promisorios.

Sin embargo, la principal fortaleza de los test serológicos se basa en su capacidad para determinar los niveles de anticuerpos y eventualmente el grado de protección inmunológica de los individuos. Para SARS-CoV-2 los ensayos más exitosos han sido los de tipo ELISA utilizando la proteína S o el dominio RBD, expresados en células de mamífero o insecto (Amanat et al., 2020).

Otras utilidades de los test serológicos han sido la identificación de individuos recuperados con respuestas de anticuerpos robustas para definir su retorno a la actividad en situaciones de cuarentena obligatoria, la implementación de pasaportes inmunológicos en los puntos de frontera, y fundamentalmente para determinación de presencia de anticuerpos, su cuantificación y su cinética durante el desarrollo de vacunas y la implementación de programas de vacunación (Krammer & Simon, 2020).

Independientemente del objetivo perseguido con los ensayos serológicos (estudios de seroconversión, cuantificación de anticuerpos, análisis de capacidad neutralizante, niveles de protección, etc.), y del diseño de la plataforma para su implementación (ELISA, test rápidos de flujo lateral, Western blot, etc.), los mismos requieren el uso de una o varias proteínas del virus (o fragmentos de estas) con propiedades antigénicas. En este sentido la glicoproteína de superficie *Spike* (S), su dominio de unión al receptor celular (RBD) y la nucleoproteína (N) fueron las más promisorias, sin embargo, esta última presenta mayor reactividad cruzada con otros coronavirus actuando en detrimento de la especificidad del método (Krammer & Simon, 2020). Además, como veremos con más detalle en la sección 3.1.2, la mayoría de las vacunas desarrolladas utilizan la glicoproteína S como inmunógeno principal, haciendo de los test serológicos basados en esta proteína o algunos de sus dominios, excelentes herramientas para estudiar su efecto protector. La aparición de nuevas variantes virales con capacidad de evadir la respuesta neutralizante generó preocupación, requiriéndose estudiar la respuesta de las vacunas frente a estas y replanteando la administración de nuevas vacunas adaptadas a estas.

## 1.2. PROBLEMA Y OBJETIVOS

La proteína S de SARS-CoV-2 es la más inmunogénica y la que presenta menor homología de secuencia frente a otros coronavirus humanos, motivo por el cual ha sido el principal antígeno de los test serológicos para detectar seroconversión frente a la infección por SARS-CoV-2. Es además, el principal componente inmunogénico de las vacunas distribuidas a nivel global y blanco importante de los anticuerpos neutralizantes, uno de los principales mecanismos de protección inmunológica para evitar la infección por el virus y su transmisión. Por otro lado, la unión de la proteína S con el receptor celular ACE2 son los elementos centrales de la unión y entrada del virus a la célula hospedera, haciendo que la capacidad de bloquear dicha interacción sea uno de los mecanismos de defensa que intentan impedir que ello ocurra.

La aparición y establecimiento de nuevas variantes de SARS-CoV-2 capaces de evadir la respuesta inmune y transmitirse de forma más eficiente, ha generado alarma e incertidumbre respecto a los niveles de protección generados por infecciones previas o por vacunas. Por tal motivo, contar con capacidad para evaluar la respuesta humoral frente a estas nuevas variantes es clave a la hora de entender el nivel de protección adquirido y las acciones a tomar.

Frente a este escenario, la implementación de ensayos alternativos de neutralización en formato de placa tipo ELISA utilizando RBD de diferentes variantes de SARS-CoV-2 y ACE2 recombinantes, resulta ser una estrategia válida para tener un acercamiento a este problema de manera rápida, económica y aplicable a un gran número de individuos. Para ello es necesario contar con un método de producción de proteínas recombinantes en forma soluble y al mismo tiempo asegurar su correcta funcionalidad, haciendo foco en la comparación de la respuesta frente a distintas variantes.

Esta capacidad de evolucionar y evadir la respuesta generada por infecciones previas y vacunas hace que la búsqueda de inhibidores de la infección viral (que van desde anticuerpos monoclonales hasta pequeños compuestos) sea un campo de investigación promisorio. La acumulación de conocimiento en este sentido puede ser de gran utilidad para enfrentar futuras variantes emergentes, pero también para otros virus que compartan similares características en sus mecanismos de infección.

Teniendo en cuenta la necesidad de contar con estrategias de análisis de respuesta neutralizante frente a múltiples variantes de SARS-CoV-2 y de generar herramientas novedosas con capacidad de evitar la infección, nos planteamos los objetivos que se describen a continuación.

### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Utilización del sistema de producción en células S2 de *Drosophila* para desarrollar estrategias serológicas que permitan analizar la respuesta humoral inducida por infección natural y vacunas frente a diversas variantes de SARS-CoV-2, y evaluar herramientas novedosas con capacidad de bloquear la interacción entre la proteína spike y el receptor celular ACE2.

### **1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- I. Producir y caracterizar versiones solubles del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S de SARS-CoV-2 (Wuhan) y del receptor celular ACE2 humano en células S2 de *Drosophila* (CAPÍTULO 2).
- II. Analizar la respuesta humoral frente a la administración de dosis de vacunación de tipo heterólogas mediante el uso de ensayos serológicos basados en la proteína RBD producida en células S2 de *Drosophila* (CAPÍTULO 3).
- III. Producir y caracterizar *in vitro* los RBD de diferentes variantes de preocupación de SARS-CoV-2 (VOCs) con el propósito de desarrollar ensayos alternativos de neutralización para estudiar la respuesta humoral en individuos vacunados (CAPÍTULO 4).
- IV. Producir el ectodominio de la proteína S de SARS-CoV-2 en células S2 de *Drosophila* para inmunizar bovinos y aislar anticuerpos específicos con CDR3 ultra-largos, que puedan dar lugar a nuevas estrategias neutralizantes adaptadas a diversas variantes virales (CAPÍTULO 5).

## CAPÍTULO 2: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA INTERFASE VIRUS-CÉLULA

### 2.1. INTRODUCCION

#### 2.1.1. GLICOPROTEINA SPIKE Y SU IMPLICANCIA EN EL MECANISMO DE INFECCIÓN

Las partículas de SARS-CoV-2 son aproximadamente esféricas con diámetros de alrededor de 90 nm y en su superficie presenta alrededor de 30 estructuras con forma de espículas conformados por trímeros de la proteína S o *spike*, distribuidos de manera irregular y presentando relativa variabilidad en cuanto a su conformación (Ke et al., 2020). La proteína S es una proteína de fusión de clase I (como la Env de retrovirus, la proteína HA del virus influenza o la proteína GP del virus del Ébola, entre muchos otros) compartiendo características estructurales, topológicas, funcionales y mecánicas con todas ellas.

Cada protómero de *spike* posee dos subunidades funcionales: en el extremo N-terminal se encuentra S1, altamente glicosilada y encargada de unirse al receptor, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra S2, anclada a la envoltura viral y responsable del mecanismo de fusión. A diferencia de la mayoría de los coronavirus relacionados, las subunidades S1 y S2 de SARS-CoV-2 están separadas por un sitio de corte de proteasas de tipo furina (muy abundantes en diversos ambientes celulares), característica que se atribuye como una de las ventajas evolutivas responsable de su alta transmisibilidad en humanos y del incremento en el tropismo celular (Walls et al., 2020).

La *spike*, luego de la remoción del péptido señal (13 aminoácidos), posee una longitud de 1260 aminoácidos donde los primeros 672 corresponden a la subunidad S1 y los restantes 588 corresponden a S2. Además, los últimos 39 aminoácidos en el extremo C-terminal de S2 corresponden al dominio citoplasmático y los 21 aminoácidos que lo preceden corresponden al dominio transmembrana, dando lugar a un dominio extracelular (ectodominio) conformado por 1200 aminoácidos (Duan et al., 2020).

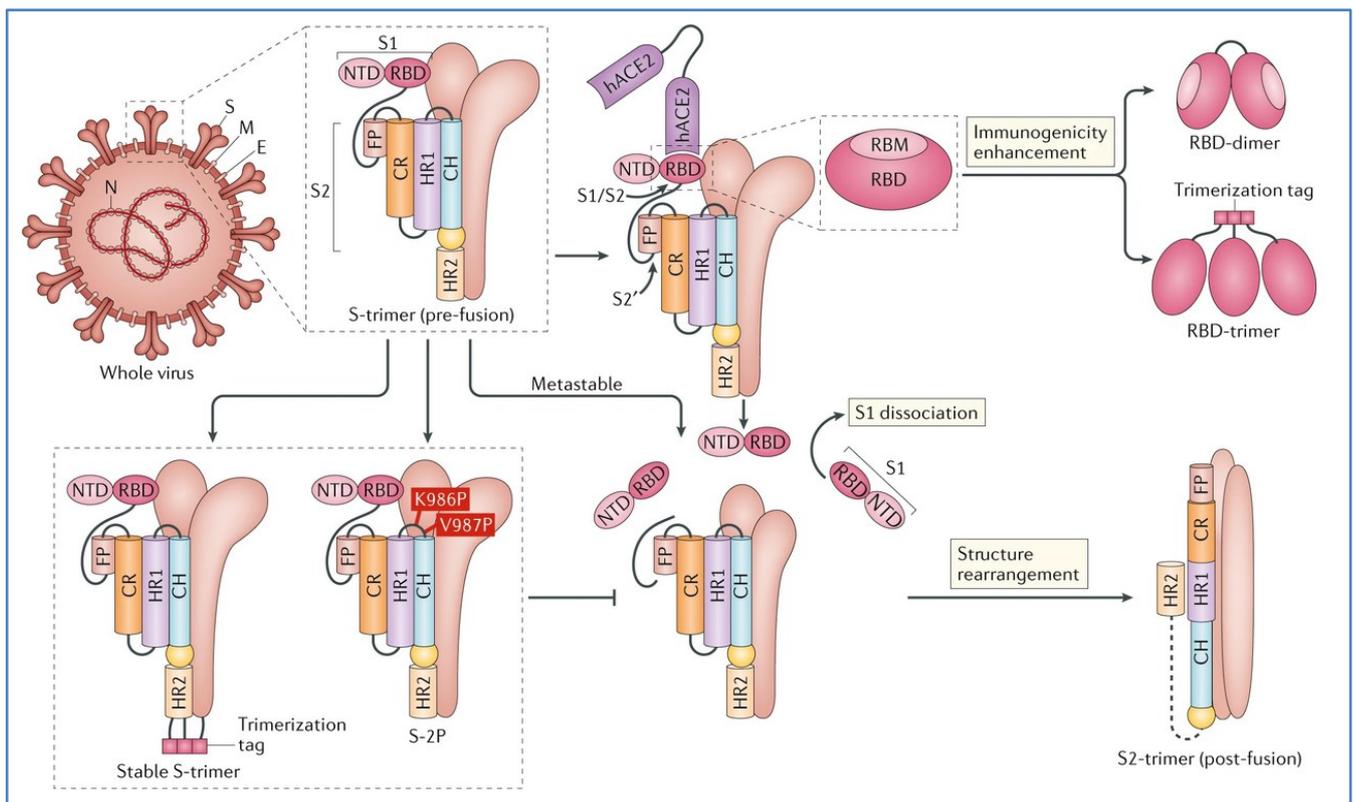
En la superficie del virión, la proteína S se encuentra mayoritariamente en un estado metaestable de pre-fusión (Ke et al., 2020), cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por crio-microscopía electrónica de partícula única (*cryo-EM*) gracias a la remoción de los dominios transmembrana y citosólico, la eliminación del sitio de procesamiento por furina (manteniendo S1 y S2 covalentemente unidas) y la sustitución por dos prolinas consecutivas en la subunidad S2 (K986P y V987P) estabilizando el estado pre-fusión (Wrapp et al., 2020) (**Figura 2**).

La proteína S pre-fusión posee las subunidades S2 de los tres protómeros (anclados a la envoltura viral) ubicadas hacia el centro del trímero, con el dominio *heptad repeat 1* o **HR1** contiguo a la envoltura. La S2 posee tres dominios  $\alpha$ -hélices identificados como: *hélice central* o **HC** (por ser la hélice que mantiene contacto entre los tres protómeros en el centro del trímero), *heptad repeat 1* o **HR1** (por ser el primero de los dos dominios de héptadas repetidas que encontramos en S2 a nivel de secuencia) y el dominio conector o *connector region* **CR** (por ser la que conecta con el dominio de fusión en el extremo N-terminal de la secuencia primaria de S2) formando un haz de  $\alpha$ -hélices. Esta estructura estabilizada por trímeros de alfa hélices mantiene ocluido en su interior cada uno de los péptidos de fusión hidrofóbicos (**FP**) mientras que las tres subunidades S1 se ubican hacia la parte distal del trímero, coronándolo y exponiendo el sitio de corte por furina en un *loop* flexible hacia el exterior del trímero (**Figura 2**).

La subunidad S1 está conformada por los dominios NTD y RBD (con plegamientos relativamente independientes del resto de la proteína) y el dominio CTD rematado por el sitio de corte por furina. El dominio RBD posee un núcleo formado por una hoja beta de cinco hebras antiparalelas y un loop extendido que conforma la interfaz de unión al receptor (RBM por "*receptor binding motif*") estabilizado por un puente disulfuro conservado (Lan et al., 2020). Presenta cierta movilidad gracias a la unión con el resto de S1 por medio de una región bisagra, que le permite adoptar de manera aparentemente estocástica uno de dos estados: "*down*" o cerrado, sobre el eje central de S2 (interactuando con el loop entre las hélices CR y HR1 y manteniendo el RBM relativamente inaccesible) y "*up*" o abierto, desplegado en forma radial a la partícula de modo de exponer el sitio de unión al receptor (Cai et al., 2020; Ke et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Esta conformación "*up*" del dominio RBD, además de facilitar la interacción con el receptor podría favorecer el re-arreglo del *loop* entre las hélices CR y HR1 y la desestabilización del estado pre-fusión, para pasar al estado intermediario que despliega el dominio FP hacia la membrana de la célula durante fusión (D. Zhou et al., 2020).

El mecanismo hasta el momento más aceptado para este dramático re-arreglo, coincide con el de otros coronavirus (Walls et al., 2017) e incluye la exposición de un segundo sitio de clivaje proteolítico en S2, donde actúa la serina proteasa 2 transmembrana (TMPRSS2) (Hoffmann, Kleine-Weber, et al., 2020) y las

cisteína proteasas catepsinas B y L (CatB/L), dando lugar a una versión más corta de S2 identificada como S2' con el dominio FP en su extremo N-terminal (**Figura 2**). Se cree que el nuevo fragmento generado (denominado S1/S2-S2') se mantiene aproximadamente en la misma posición (contactando con la hélice central **HC** de S2') y que las subunidades S1 (previamente proteolizadas por furina) se liberan favoreciendo la desestabilización del estado pre-fusión (**Figura 2**). Cuando esto ocurre, se desdobra el *loop* que mantiene las  $\alpha$ -hélices HC y HR1 asociadas en forma antiparalela y estas forman una extensa  $\alpha$ -hélice que se mantiene unida a sus homólogas de los otros dos protómeros en una estructura *coiled coil* de tres cadenas ( $\alpha$ -hélices superenrolladas). Así, el péptido de fusión (ubicado en el extremo N-terminal de S2') queda orientado en la región distal de este intermediario inestable (cuya estructura se desconoce), para anclarse a la membrana plasmática de la célula receptora. Este intermediario generado por este dramático re-arreglo permite que las subunidades S2' mantengan unidas ambas bicapas lipídicas, para que finalmente se replieguen de manera ordenada, dando lugar a la conformación post-fusión responsable de acercar las membranas y permitir la entrada del virus (Cai et al., 2020) (**Figura 2**).



**Figura 2: Esquema de los dominios de la proteína S y su rol en los mecanismos de unión al receptor y fusión de membranas. Tomado de (Dai & Gao, 2021))**

El ectodominio de la proteína S posee 30 cisteínas que forman 15 puentes disulfuro intra-subunidad (10 en S1 y 5 en la región extracelular de S2). Los puentes disulfuro de la subunidad S1 se distribuyen de tal forma que solo uno de ellos estabiliza la interacción del RBD y el dominio CTD; los 9 restantes se ubican de tal forma que encontramos 3 estabilizando el dominio NTD, 3 estabilizando el CTD y 3 en el RBD. En

particular, el puente disulfuro conservado entre las cisteínas 480 y 488, es responsable de estabilizar el *loop* extendido de RBD que interactúa con ACE2.

La glicosilación de la proteína S es fundamental para asegurar su correcto plegamiento, modular la actividad de las proteasas celulares (que como vimos previamente, son clave en el proceso de fusión) y evadir la respuesta inmune (innata y adaptativa). Se identifican 22 sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína *spike*, de los cuales 5 fueron identificados sin modificar (Shajahan et al., 2020) mientras que 16 fueron confirmados por crio-microscopía electrónica (Walls et al., 2020) y 17 por espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS/MS). Su composición glucídica está mayoritariamente caracterizada por glicanos de tipo complejo y glicanos ricos en manosa, con una distribución de 6 sitios en S2 y 11 sitios en S1 (dos de ellos en el RBD). Además, se identificaron dos sitios de O-glicosilación en el extremo N-terminal del RBD, además de otros posibles sitios en el resto de la proteína S (Sanda et al., 2021; Shajahan et al., 2020). La presencia de estos glicanos en el RBD o cerca de él ha sido considerada otro posible elemento para aumentar la transmisibilidad de SARS-CoV-2, aumentando la afinidad por el receptor celular; sin embargo, diversos estudios han demostrado que su efecto directo es nulo o muy bajo, con posibles implicancias indirectas sobre la entrada del virus (Sun et al., 2020; Q. Yang et al., 2020).

### **2.1.2. EL RECEPTOR CELULAR ACE2**

La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) fue identificada como el receptor celular del SARS-CoV en 2003 (W. Li et al., 2003), lo que facilitó su rápida identificación como responsable de la interacción de SARS-CoV-2 con la célula receptora (Hoffmann, Kleine-Weber, et al., 2020; Walls et al., 2020; Yan et al., 2020). En ambos casos la interacción del virus con ACE2 se da a través del dominio de unión al receptor (RBD) de la glicoproteína S, no obstante la afinidad de SARS-CoV-2 es superior (Lan et al., 2020; Walls et al., 2020; Q. Wang et al., 2020; Wrapp et al., 2020), confiriéndole otra ventaja respecto a su alta transmisibilidad en humanos.

La enzima ACE2 es una proteína transmembrana cuyo dominio N-terminal presenta actividad peptidasa dependiente de zinc (PD por "*peptidase domain*"), capaz de catalizar la hidrólisis de las hormonas angiotensina I y II, generando un efecto vasodilatador; mientras que su dominio C-terminal posee alta homología con la proteína renal colectrina (CLD por "*collectrin like domain*"), y al igual que esta, participa en la regulación del transporte de aminoácidos al interior de la célula. Es *per se* un blanco terapéutico importante por su implicancia en diversas patologías como enfermedades cardiovasculares y pulmonares, y su expresión se da en diversos órganos como corazón, riñones, testículos, vías respiratorias superiores,

pulmones, intestino e hígado (Gheblawi et al., 2020). Una versión soluble del ectodominio de ACE2 (clivada por ADAM-17, cuya actividad está ligada a procesos inflamatorios) es también encontrada en plasma con altos niveles.

ACE2 se expresa en la superficie apical de células epiteliales de una gran diversidad de tejidos y órganos, no obstante la correlación entre los órganos con altos niveles de expresión de ACE2 y aquellos donde se detecta alta carga viral, no siempre es evidente; por ejemplo, la expresión de ACE2 en vías respiratorias superiores y pulmones (donde la carga viral es elevada) es inferior a otros tejidos en condiciones normales. Esto podría explicarse por el hecho de que unas pocas moléculas de ACE2 pueden ser suficientes para posibilitar la infección por SARS-CoV-2 (Salamanna et al., 2020; Trypsteen et al., 2020).

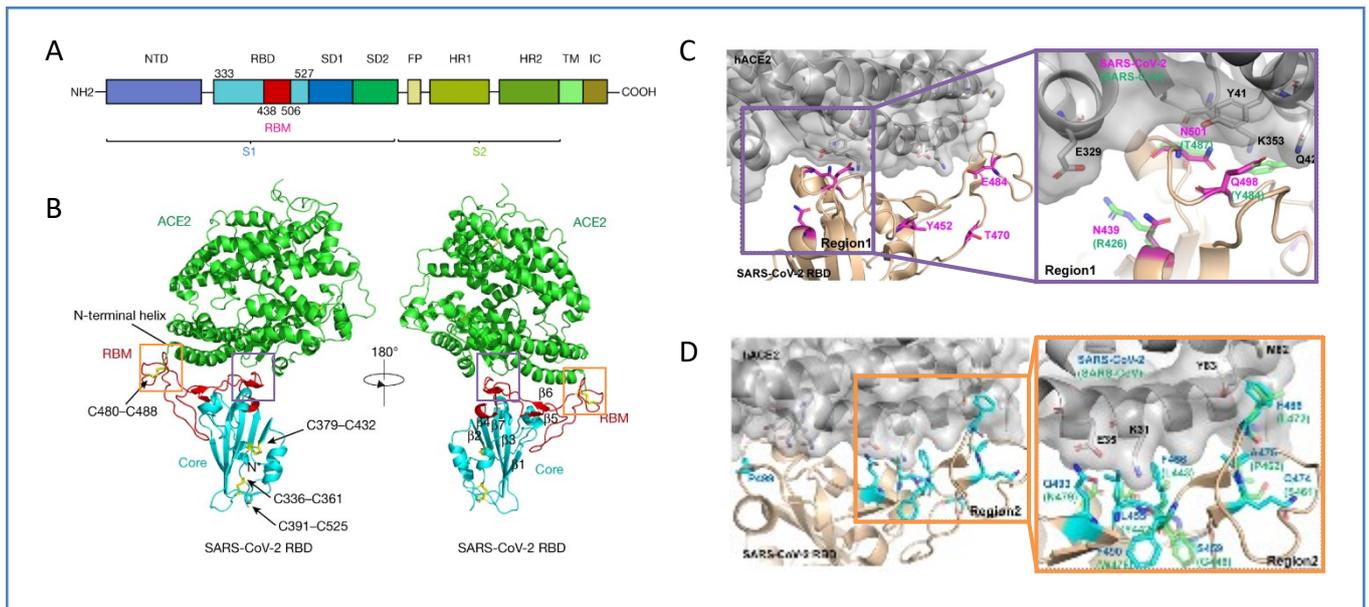
La presencia de la versión clivada soluble de ACE2 en plasma aumenta en respuesta a diversos procesos inflamatorios (también en respuesta a la infección por SARS-CoV-2), sin embargo, esta forma de ACE2 no representa una vía de entrada para el virus sino que más bien podría estar asociada a un efecto protector (Trypsteen et al., 2020). De hecho, diversos trabajos han planteado la posibilidad de administrar ACE2 soluble (Abd El-Aziz et al., 2020; Monteil et al., 2020; Zoufaly et al., 2020), versiones modificadas con mayor afinidad (Chan et al., 2020) o péptidos derivados de ACE2 (G. Zhang et al., 2020), con el objetivo de neutralizar los RBD y reducir la capacidad del virus de iniciar el proceso infeccioso.

Estructuralmente, ACE2 es una proteína de membrana compuesta por 25  $\alpha$ -hélices y 4 hebras  $\beta$ , que forma homodímeros en la superficie celular. En el extremo N-terminal, los residuos 19-615 conforman el dominio catalítico PD que se ubican en el extremo distal de la estructura. Por su parte, el dominio CLD está comprendido por los residuos 616 a 768, dando lugar a un dominio con plegamiento tipo ferredoxina (residuos 616 a 726), el cual se presenta como el principal responsable de la dimerización, seguido de una única  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal responsable del anclaje a la bicapa lipídica. Esta  $\alpha$ -hélice y algunos residuos del dominio de dimerización (tipo ferredoxina) establecen contactos para formar heterodímeros con la proteína B<sup>0</sup>AT1, una proteína transmembrana transportadora de aminoácidos, responsable de la internalización de aminoácidos neutros en las células intestinales (Yan et al., 2020).

### **2.1.3. INTERACCIÓN ENTRE RBD Y ACE2**

La interacción de ACE2 y el dominio RBD de la proteína S se da casi exclusivamente a través de residuos polares del dominio PD, fundamentalmente a nivel de la primera  $\alpha$ -hélice, y en menor medida la segunda  $\alpha$ -hélice (contigua y antiparalela a la primera) y un *loop* alejado a nivel de secuencia que conecta las  $\beta$ -hebras 3 y 4 (Lan et al., 2020; Yan et al., 2020). La superficie RBM comprendida por los residuos 438-506 del RBD, es relativamente alargada y posee una topología planar con cierta curvatura para alojar la  $\alpha$ -

hélice 1 de ACE2 (**Figura 3.A-B**), anclándose a través de dos regiones ubicadas en los extremos de la misma: la región 1 en la que el RBD contacta principalmente con el *loop* de las hebras  $\beta$  3 y 4 de ACE2; y la región 2 donde el *loop* extendido estabilizado por el puente disulfuro (entre las cisteínas 480 y 488) contacta fundamentalmente con el extremo N-terminal de la  $\alpha$ -hélice 1 (**Figura 3.C-D**). Diversos residuos del RBD de SARS-CoV-2 que difieren de SARS-CoV han sido identificados como los responsables del aumento de la afinidad por el receptor.



**Figura 3: Interacción entre RBD y ACE2. A)** Dominios de spike con el core del RBD en cian y el sitio de unión a ACE2 (RBM) en rojo. **B)** Vista lateral del complejo RBD/ACE2 con el mismo código de colores que en A y ACE2 en verde. Las regiones 1 y 2 se marcan con rectángulos violetas y naranja, respectivamente. *Tomado de* (Lan et al., 2020). **C-D)** Detalle de los contactos a nivel de las regiones 1 y 2. *Tomado de* (Yi et al., 2020).

De acuerdo con lo anterior, podemos decir que la proteína S de SARS-CoV-2 y en particular su dominio RBD son claves en la unión al receptor ACE2 y en la fusión del virus con la célula hospedera, convirtiéndolos en objetivos clave de la respuesta inmune y de las estrategias terapéuticas.

### 2.1.4. PRODUCCION DE GLICOPROTEÍNAS VIRALES EN FORMA RECOMBINANTE

Para desarrollar estrategias capaces de llevar a cabo estos objetivos, resulta fundamental contar con capacidad de producir proteínas funcionales.

Como vimos anteriormente, la **glicoproteína de superficie** de SARS-CoV-2 es el principal candidato para la producción de vacunas en cualquiera de las plataformas disponibles (Y. Dong et al., 2020). Además, por su rol clave en la unión al receptor, la fusión con la membrana celular, su inmunogenicidad y su baja reactividad cruzada, la proteína S (y el RBD) son un blanco estratégico para el desarrollo de test serológicos, así como diversas estrategias terapéuticas. A su vez, la proteína **ACE2** actúa de manera íntima

con las anteriores, participando de la interfaz virus-célula hospedera, y por tal motivo es de gran utilidad en la realización de estudios *in vitro* llevados a cabo con la finalidad de comparar la funcionalidad de las proteínas virales y el efecto de los anticuerpos neutralizantes sobre dicha interacción. Por tal motivo, la expresión recombinante de estas proteínas de manera simple, reproducible, escalable e independiente resulta clave para el desarrollo de diversas aplicaciones, así como la elección de sistemas de expresión que se adecuen a los requerimientos de estas.

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más utilizados (bacterias, levaduras, plantas, células de insecto y células de mamíferos) presentan diferencias en cuanto a rendimiento de producción, modificaciones postraduccionales, etc., que se traducen en ventajas y desventajas de acuerdo con su aplicación (Mizukami et al., 2018).

En términos de costos de producción, los sistemas de expresión bacterianos se presentan como los más económicos, gracias a su velocidad de producción, bajos requerimientos de infraestructura y altos rendimientos de producción. Sin embargo, la ausencia de maquinaria celular de glicosilación los ha dejado relegados en cuanto a la producción de glicoproteínas. La expresión del dominio RBD de SARS-CoV en sistemas bacterianos ha demostrado ser compleja, requiriendo purificación a partir de cuerpos de inclusión y fusión a proteínas de solubilización (Chen et al., 2005; Chuck et al., 2009) que lo convierten en un sistema relativamente complejo en comparación con otros como células de mamífero o células de insecto (Du et al., 2009).

Las levaduras se presentan como una alternativa válida a los sistemas bacterianos siendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* las más utilizadas. Presentan características comunes con las bacterias (crecimiento rápido, procesos de fermentación escalables y de bajo costo, facilidad de manipulación genética y expresión estable) pero además, son capaces de introducir modificaciones postraduccionales como glicosilación, isomerización de puentes disulfuro, procesamiento proteolítico, así como secretar proteínas correctamente plegadas en el medio de cultivo. Su principal desventaja radica en las diferencias a nivel del patrón de glicosilación (hiper-manosilación) respecto a los sistemas de expresión en células eucariotas (Mizukami et al., 2018; Tripathi & Shrivastava, 2019). Diferentes dominios de la glicoproteína de superficie de SARS-CoV han sido expresados en *Pichia pastoris* (Chuck et al., 2009), mientras que para SARS-CoV-2 se ha producido el dominio RBD con altos rendimientos y niveles de pureza, no obstante presentando una gran heterogeneidad de tamaño a raíz de la glicosilación característica de levaduras (Consortium, 2020).

Los sistemas de expresión heteróloga basados en plantas han demostrado ser útiles para la expresión recombinante de proteínas virales. Su aplicación en vacunas y bioterapéuticos ha resultado

particularmente promisorio gracias a la similitud con humanos en las estructuras de glicanos y a la ausencia de endotoxinas y patógenos potencialmente riesgosos. Además, pueden ser crecidas en medios de cultivo basales de manera robusta y con gran capacidad de escalado (Mizukami et al., 2018). Entre sus desventajas se destacan las dificultades planteadas durante la transfección o la extracción de proteínas, así como los bajos niveles de producción de biomasa en comparación con los sistemas microbianos (Muthamilselvan et al., 2019). Recientemente se han publicado resultados describiendo la producción de dominios de la proteína Spike (S1, RBD) de SARS-CoV-2 en *Nicotiana benthamiana* con rendimientos entre 8-20 mg por kg de biomasa (Mamedov et al., 2020; Rattanapisit et al., 2020).

Debido a la gran fidelidad que ofrecen respecto a las estructuras de glicanos, las células de mamífero son la elección preferida a la hora de producir glicoproteínas en forma recombinante, siendo las células CHO, BHK21 (hámster) y NS0 y Sp2/0 (murino) las que destacan en cuanto a su utilización para proteínas terapéuticas. No obstante, el uso de líneas celulares de origen humano (HEK293, HT-1080, PER.C6, CAP, HKB-11 y HeLa, entre otras) se presenta como una alternativa cada vez más utilizada a la hora de evitar problemas relacionados con la presencia de epítomos de origen murino altamente inmunogénicos y patrones de glicosilación no-humanos. La principal desventaja que presentan las células de mamífero es que los rendimientos de producción son muchas veces moderados y el costo de producción elevado dado que presentan velocidades de crecimiento relativamente lentas, utilizan medios más complejos y requieren CO<sub>2</sub> para mantener el pH en el rango adecuado (Mizukami et al., 2018; Tripathi & Shrivastava, 2019). A pesar de ello, las células de mamífero representan el sistema más utilizado para expresar glicoproteínas virales, y la proteína S de SARS-CoV-2 (junto a sus dominios) no escapa a la regla.

Las células de insecto son un sistema eucariota que se presentan como una alternativa más accesible a las células de mamífero en términos de rendimiento, costos de producción, tiempos de producción y escalabilidad (Tripathi & Shrivastava, 2019). Al igual que las células de mamífero, son capaces de producir proteínas correctamente plegadas y secretarlas al medio, y el patrón de glicosilación es similar al de mamíferos. No obstante, poseen algunas características diferentes como la incapacidad de agregar residuos de ácido siálico que constituyen su principal desventaja en aquellos casos que esto es clave. El sistema más utilizado de expresión en células de insecto es el de baculovirus con las células Sf9 o High-Five™ junto a otras como S2, Sf21 y Tn-368 (Mizukami et al., 2018; Tripathi & Shrivastava, 2019). La glicoproteína S de SARS-CoV-2 ha sido producida en células de insecto utilizando baculovirus y mostrando utilidad incluso en la generación de inmunógenos (T. Li et al., 2020; Mi et al., 2021; J. Yang et al., 2020). Las células S2 de *Drosophila* han sido utilizadas en la producción de glicoproteínas virales de membrana de VIH, Rabia y Dengue, entre otros (Astray et al., 2016), así como de los coronavirus MERS y MHV (mouse

hepatitis virus) (Walls et al., 2017). En nuestro laboratorio hemos utilizado este sistema para expresar y purificar la glicoproteína Env del virus de la leucemia bovina (VLB) y la glicoproteína soluble sGP del virus Ébola.

Considerando las ventajas del sistema de expresión en células S2 de *Drosophila* y la experiencia previa del grupo utilizando este sistema, nos propusimos desarrollar una metodología para producir las proteínas de la interfase virus-célula de SARS-CoV-2 y la célula receptora, con el propósito de caracterizar las proteínas y su interacción, asegurando su funcionalidad y aplicación en ensayos serológicos.

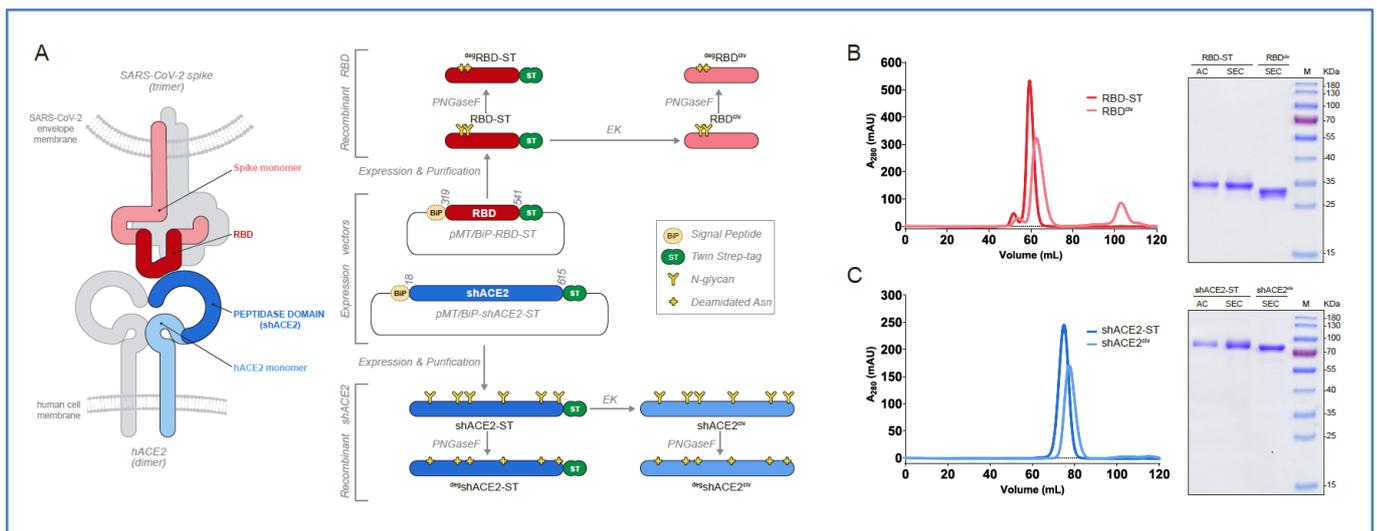
## **2.2. OBJETIVO ESPECIFICO 1**

Producir y caracterizar versiones solubles del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S de SARS-CoV-2 (Wuhan) y del receptor celular ACE2 humano en células S2 de *Drosophila*.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

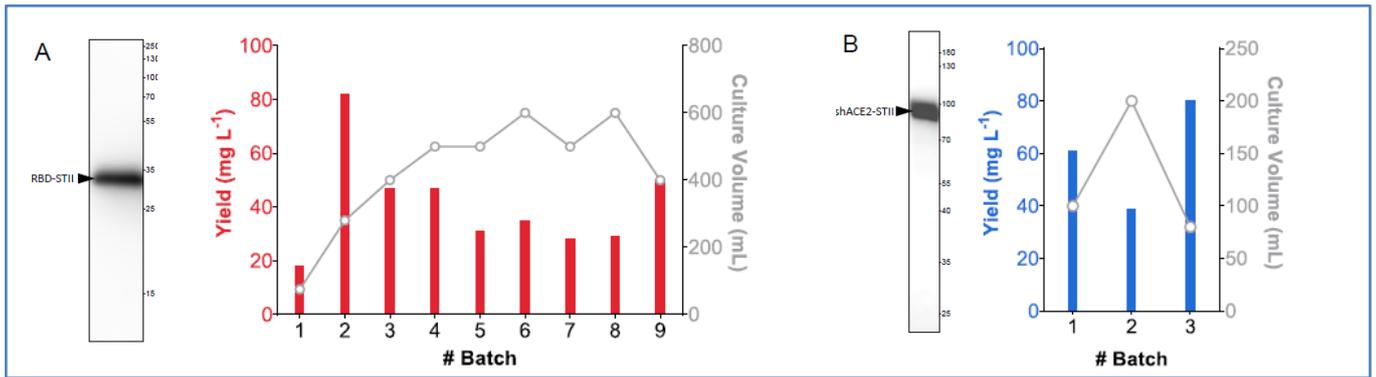
### 2.3.1. OBTENCIÓN DE RBD Y shACE2 A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE S2.

Las secuencias codificantes del dominio de unión al receptor (RBD) de la variante ancestral Wuhan de SARS-CoV-2 y el dominio peptidasa soluble de la proteína ACE2 humana (shACE2) fueron clonados en un vector de expresión para células de insecto, precedidos de un péptido señal (BiP) para dirigir su secreción al espacio extracelular, con un doble *Strep-tag* (removible con enteroquinasa bovina, EK) en el extremo C-terminal. El diseño de las construcciones para producir ambas glicoproteínas recombinantes y sus productos de transformación luego del tratamiento con EK y PNGasa F se resumen en la **Figura 4.A** (acompañados de la nomenclatura utilizada en este capítulo) y se describen en la sección dedicada a la Metodología.



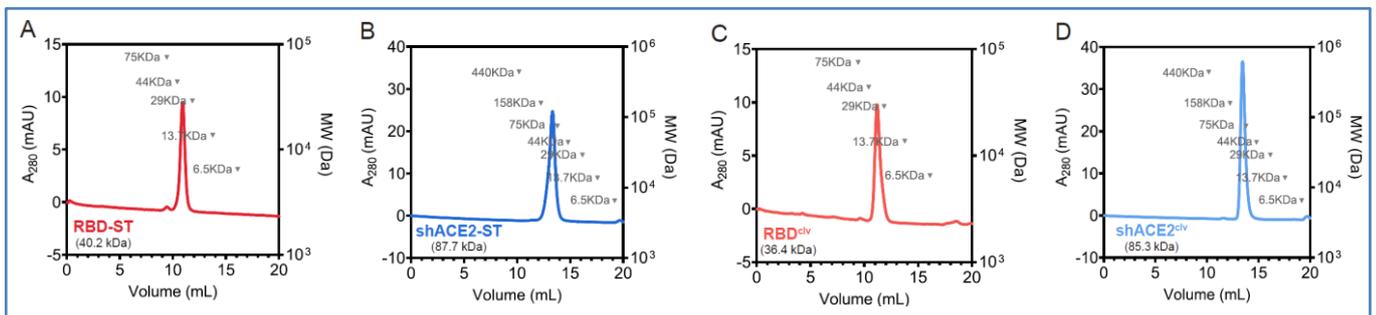
**Figura 4: Expresión y purificación de las proteínas recombinantes RBD y shACE2.** A) Esquema de la interfaz virus-célula con los monómeros Spike y ACE2 en tonos rojo y azul, respectivamente (izquierda) y las construcciones plasmídicas junto a sus respectivos productos (*derecha*). B) Purificación por SEC preparativa (*izquierda*) y análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie (*derecha*) de RBD-ST y RBD<sup>clv</sup>. C) Purificación por SEC preparativa (*izquierda*) y análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie (*derecha*) de shACE2-ST y shACE2<sup>clv</sup>. AC, cromatografía de afinidad; SEC, cromatografía de exclusión molecular; M, marcador de peso molecular.

Tanto RBD-ST como shACE2-ST se obtuvieron en el sobrenadante del cultivo y se purificaron mediante cromatografía de afinidad (CA) con rendimientos promedio de 40 y 60 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (**Figura 5**). Estos rendimientos resultan promisorios, superando los obtenidos con construcciones similares en células de insecto (Korn et al., 2020; T. Li et al., 2020; Maffei et al., 2021).



**Figura 5: Purificación de RBD-ST y shACE2-ST. A-B)** Análisis por *western blot* con Streptactina-HRP a partir de sobrenadante de cultivo tras 48 horas de inducción de la expresión de proteínas (izquierda) y comparación de los rendimientos de purificación a partir de diferentes lotes de diferente volumen. El panel A corresponde a la producción de RBD-ST y el panel B corresponde a shACE2-ST.

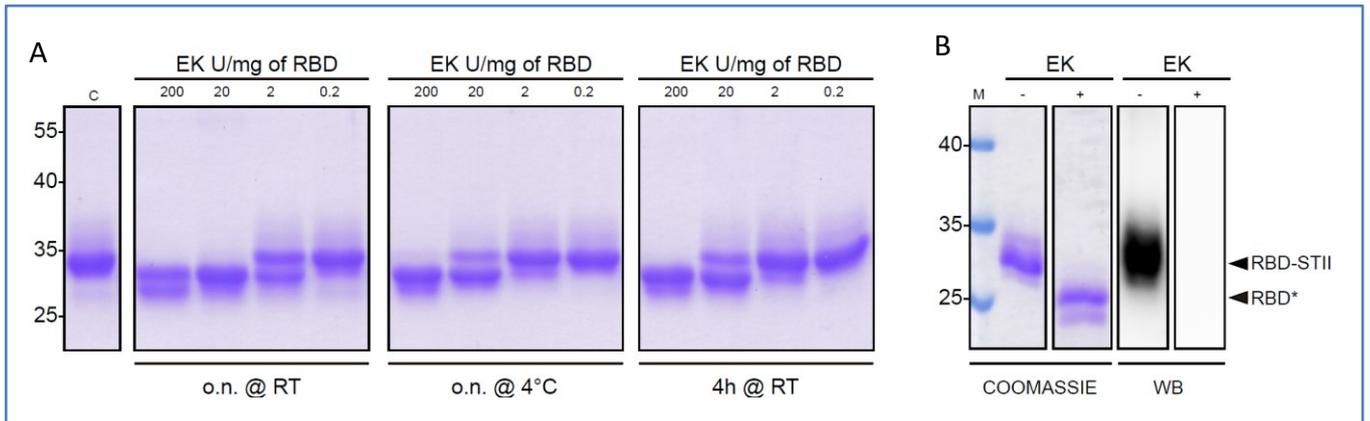
Además, RBD-ST y shACE2-ST se purificaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC) como proteínas monoméricas (**Figura 4.B-C**), con volúmenes de exclusión correspondientes a 40,2 kDa y 87,7 kDa, respectivamente (**Figura 6.A-B**). Las diferencias entre el peso molecular estimado a partir de la secuencia primaria de las construcciones y el estimado por SEC, coincide con la presencia de glicanos en ambas proteínas.



**Figura 6: Análisis de tamaños por cromatografía de exclusión molecular analítica.** Las proteínas recombinantes purificadas se analizaron utilizando columnas analíticas Superdex 75 (A,C) y Superdex 200 (B,D). Los volúmenes de exclusión correspondientes a los estándares de calibración de peso molecular se muestran en gris y los pesos moleculares calculados para cada muestra se muestran entre paréntesis debajo del nombre que la identifica.

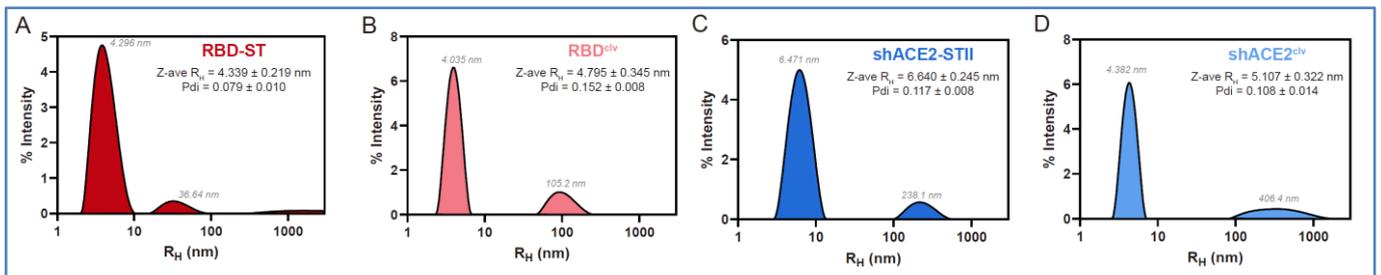
### 2.3.2. LA REMOCIÓN DEL STREP-TAG NO COMPROMETE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS.

La utilización del *Strep-tag* en nuestras construcciones obedece a una estrategia multipropósito, no sólo como tag de purificación sino también para obtener versiones inmovilizadas y/o marcados de las proteínas, para su utilización en ensayos de interacción *in vitro*. Por tal motivo, es imperativo lograr su remoción completa sin afectar la estabilidad y solubilidad de las muestras ni comprometer los ensayos posteriores. Para ello se optimizó un protocolo de remoción del Strep-tag, incubando 1 mg de RBD-ST con 20 U de EK bovina, overnight a 25°C. Este protocolo permitió remover de manera completa el Strep-tag y se utilizó posteriormente con ambas proteínas (**Figura 7**).



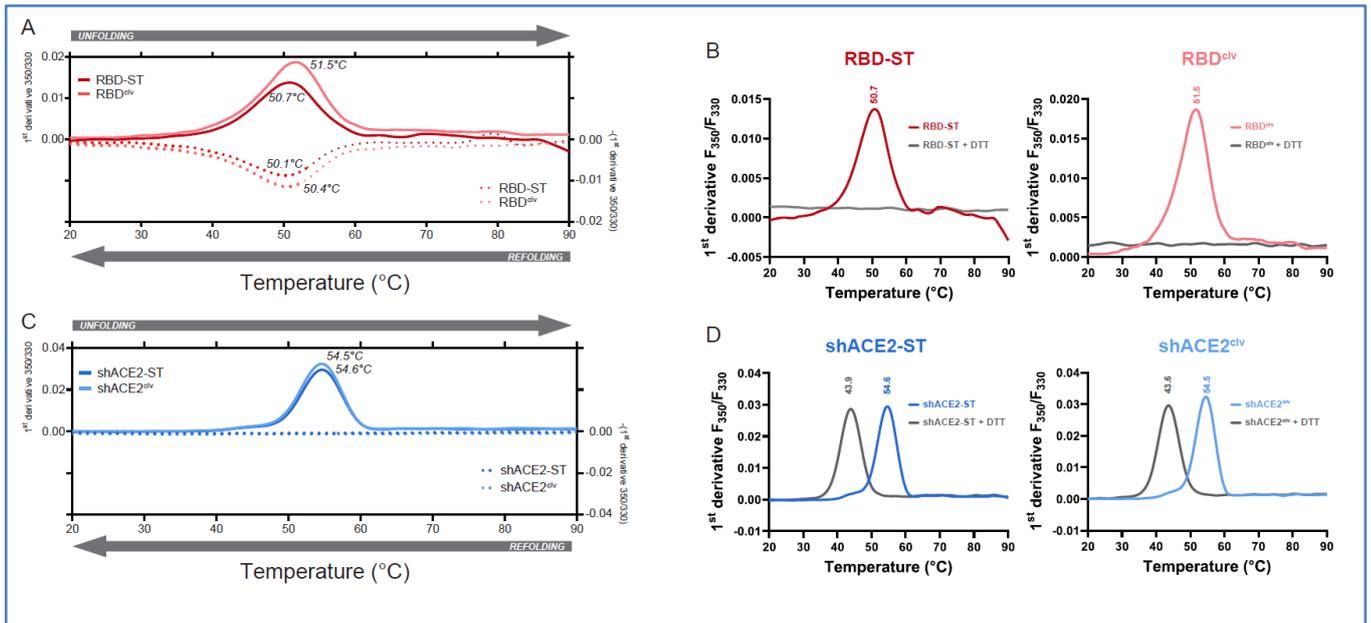
**Figura 7: Optimización del protocolo de remoción del Strep-tag mediante tratamiento proteolítico con enteroquinasa bovina (EK).** **A)** Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie de distintas fracciones de RBD-ST incubadas con concentraciones crecientes de EK (desde 0,2 hasta 200 unidades por mg de RBD-ST) a diferentes temperaturas (4°C y 25°C) y durante tiempos variables (4 horas u *overnight*). **B)** Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie y western blot con Streptactina-HRP, de RBD-ST incubado con EK (20 U por mg de RBD-ST *overnight* a 25°C) para remover el Strep-tag. Los carriles sometidos al tratamiento proteolítico se distinguen con un signo positivo (+) mientras que los controles sin EK se presentan con un signo negativo (-).

Tanto RBD<sup>clv</sup> como shACE2<sup>clv</sup> presentaron una reducción de ~3kDa respecto de sus homologas dotadas de Strep-tag (**Figura 4.B-C**, **Figura 6.C-D**), mientras que la solubilidad no se vio afectada tal como se evidencia en los ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) (**Figura 8**).



**Figura 8: Radio hidrodinámico de las proteínas recombinantes purificadas.** Distribuciones de tamaño de RBD-ST (**A**), RBD<sup>clv</sup> (**B**), shACE2-ST (**C**) y shACE2<sup>clv</sup> (**D**) medidas por DLS. Los valores de radio hidrodinámico ( $R_H$ ) de cada pico (calculados como la media de cada distribución) se muestran en gris junto a cada pico. El valor de *Z-average* global y el índice de polidispersión se calcularon para cada réplica y los valores medios globales ( $\pm$  desviación estándar) se muestran en negro debajo del nombre que identifica a cada muestra.

La termoestabilidad de RBD-ST y RBD<sup>clv</sup> analizada por fluorimetría de barrido diferencial (nanoDSF) tampoco arrojó grandes diferencias, mostrando temperaturas de fusión ( $T_M$ ) de 50,7 y 51,5 °C, respectivamente (**Figura 9.A**). Estos valores resultan superiores a los publicados con una construcción similar obtenida a partir de células de insecto (T. Li et al., 2020). Ambas versiones de RBD mostraron desnaturalización térmica reversible con valores de  $T_M$  de “*refolding*” ligeramente inferiores (50,1°C para RBD-ST y 50,4°C para RBD<sup>clv</sup>). En presencia de DTT no se detectaron transiciones de desnaturalización (**Figura 9.B**), probablemente debido a la rápida desestabilización estructural como consecuencia de la reducción de puentes disulfuro, que se sabe tienen un papel crítico en la estructura secundaria de la RBD (Grishin et al., 2022) afectando incluso a su unión con el receptor celular ACE2 (Shi et al., 2022).



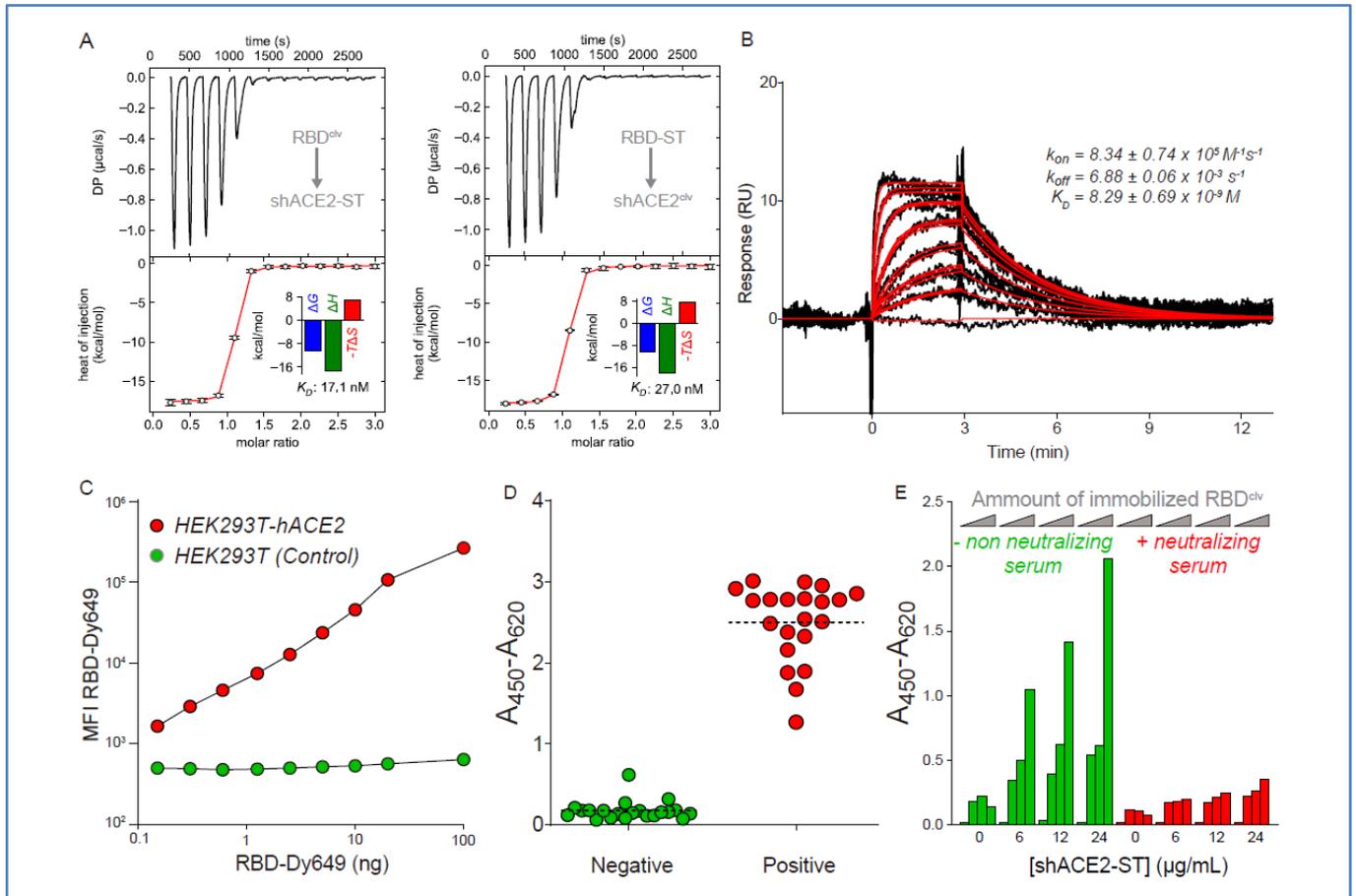
**Figura 9: Termoestabilidad de las proteínas recombinantes RBD y shACE2.** A,C) Análisis por nanoDSF para evaluar la desnaturalización y re-naturalización de los pares RBD-ST/RBD<sup>clv</sup> (A) y shACE2-ST/shACE2<sup>clv</sup> (C). B,D) Análisis por nanoDSF para evaluar la desnaturalización y re-naturalización de las proteínas en presencia de un agente reductor en exceso. El desplegamiento se representa con líneas continuas, mientras que la renaturalización se muestra con líneas discontinuas, utilizando el mismo código de colores. Los trazos de color gris corresponden a las medidas realizadas en presencia de DTT. Los valores de T<sub>M</sub> se muestran junto a cada transición.

En paralelo, shACE2-ST y shACE2<sup>clv</sup> mostraron una desnaturalización térmica irreversible con valores de T<sub>M</sub> ligeramente superiores a los de RBD (54,6 y 54,5 °C, respectivamente), en concordancia con reportes previos (Glasgow et al., 2020) (Figura 9.C). Sin embargo, a diferencia de RBD, las transiciones en presencia de DTT se siguen detectando con ambas versiones de shACE2, mostrando un desplazamiento en los valores de T<sub>M</sub> >10 °C en exceso de DTT (Figura 9.D). Estos resultados sugieren que la reducción de los puentes disulfuro afecta la estabilidad de la proteína pero tienen un rol menos preponderante en el plegamiento global de shACE2, coincidiendo con resultados obtenidos previamente en sistemas de expresión de células humanas (Grishin et al., 2022).

### 2.3.3. LAS PROPIEDADES DE INTERACCIÓN ENTRE RBD Y shACE2 SE ASEMEJAN A LAS DE SUS CONTRAPARTES NATURALES

La interacción entre RBD y shACE2 fue analizada por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) utilizando dos configuraciones experimentales independientes: titulando shACE2-ST con RBD<sup>clv</sup> y titulando shACE2<sup>clv</sup> con RBD-ST (Figura 10.A). Ambos experimentos se analizaron de forma independiente, confirmando la estequiometría de unión 1:1 y proporcionando parámetros termodinámicos muy similares (caracterizados por una fuerte contribución entálpica asociada a contactos moleculares hidrofílicos (Lan et al., 2020)). Estos resultados permiten concluir que la remoción del Strep-Tag tampoco afecta la capacidad de

interacción de las moléculas, arrojando valores de  $K_D$  en el rango 17.1-27.0 nM, coincidiendo con resultados reportados con proteínas expresadas en células humanas en condiciones similares (Prévost et al., 2021) (Tabla 1).



**Figura 10: Análisis funcional de las proteínas recombinantes RBD y shACE2.** **A)** Análisis por ITC de shACE2-ST titulada con RBD<sup>clv</sup> (izquierda) y shACE2<sup>clv</sup> titulada con RBD-ST (derecho). Cada panel está compuesto por el termograma corregido tras la sustracción de la línea de base (arriba) acompañado de una representación esquemática de la titulación (recuadro superior). Los valores de calor obtenido de cada inyección con el ajuste a un modelo de heteroasociación en rojo (abajo) se presentan acompañados de la firma termodinámica correspondiente (presentados en la Tabla 1), con los valores de  $K_D$  en unidades nM (recuadro inferior). **B)** Experimento representativo de SPR con RBD<sup>clv</sup> inyectado sobre shACE2-ST capturado. Los sensorgramas (negro) y el correspondiente ajuste a un modelo de interacción Langmuir 1:1 (rojo) se presentan superpuestos, junto con los valores promedio de los parámetros cinéticos calculados a partir de tres experimentos independientes (Tabla 2). **C)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) medida por citometría de flujo en células que sobre expresan hACE2 (rojo) y células control (verde), incubadas con cantidades crecientes de RBD-ST fluorescente. **D)** ELISA con un conjunto de sueros humanos identificados como negativos (prepandémicos) y positivos (confirmados por PCR y un ELISA comercial anti-SARS-CoV-2) utilizando RBD<sup>clv</sup> como antígeno. **E)** ELISA de competición entre diferentes concentraciones de shACE2-ST (eje x) y dos muestras de suero: un suero negativo no neutralizante (prepandémico, en verde) y un suero positivo neutralizante (confirmado con un sVNT comercial, en rojo). Se utilizaron cantidades crecientes de RBD<sup>clv</sup> inmovilizado (representado con triángulos grises encima de cada grupo).

**Tabla 1: Análisis de la unión RBD-shACE2 mediante ITC.** Parámetros termodinámicos obtenidos por ITC tras la sustracción de línea base, integración y ajuste a un modelo de hetero-asociación ( $A+B \rightarrow AB$ ). Los parámetros obtenidos se utilizaron para preparar las respectivas firmas termodinámicas representadas como recuadros en la Figura 10.A.

| DISEÑO EXPERIMENTAL                | $K_D$ (M) | $\Delta G$ (kcal/mol) | $\Delta H$ (kcal/mol) | $\Delta S$ (cal/mol*K) |
|------------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| RBD <sup>clv</sup> vs. shACE2-STII | 1,71E-08  | -10,595               | -17,285               | -22,441                |
| RBD-STII vs. shACE2 <sup>clv</sup> | 2,70E-08  | -10,326               | -17,959               | -25,601                |

También evaluamos la interacción mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR), inyectando RBD<sup>clv</sup> sobre shACE2-ST capturado en una superficie derivatizada con streptactina. Los juegos de datos experimentales obtenidos con densidades de shACE2-ST variables dieron resultados similares con un valor promedio de  $K_D = 8,29 \pm 0,69$  nM (**Figura 10.B, Tabla 2**), en coherencia con reportes obtenidos con proteínas expresadas tanto en células humanas como de insecto (Lan et al., 2020; H. Liu, Zhang, et al., 2021). Complementariamente, utilizamos citometría de flujo para demostrar que RBD-ST producido en células de insecto es capaz de interactuar con hACE2 “full-length” nativa sobre-expresada en la superficie de células HEK293T (**Figura 10.C**).

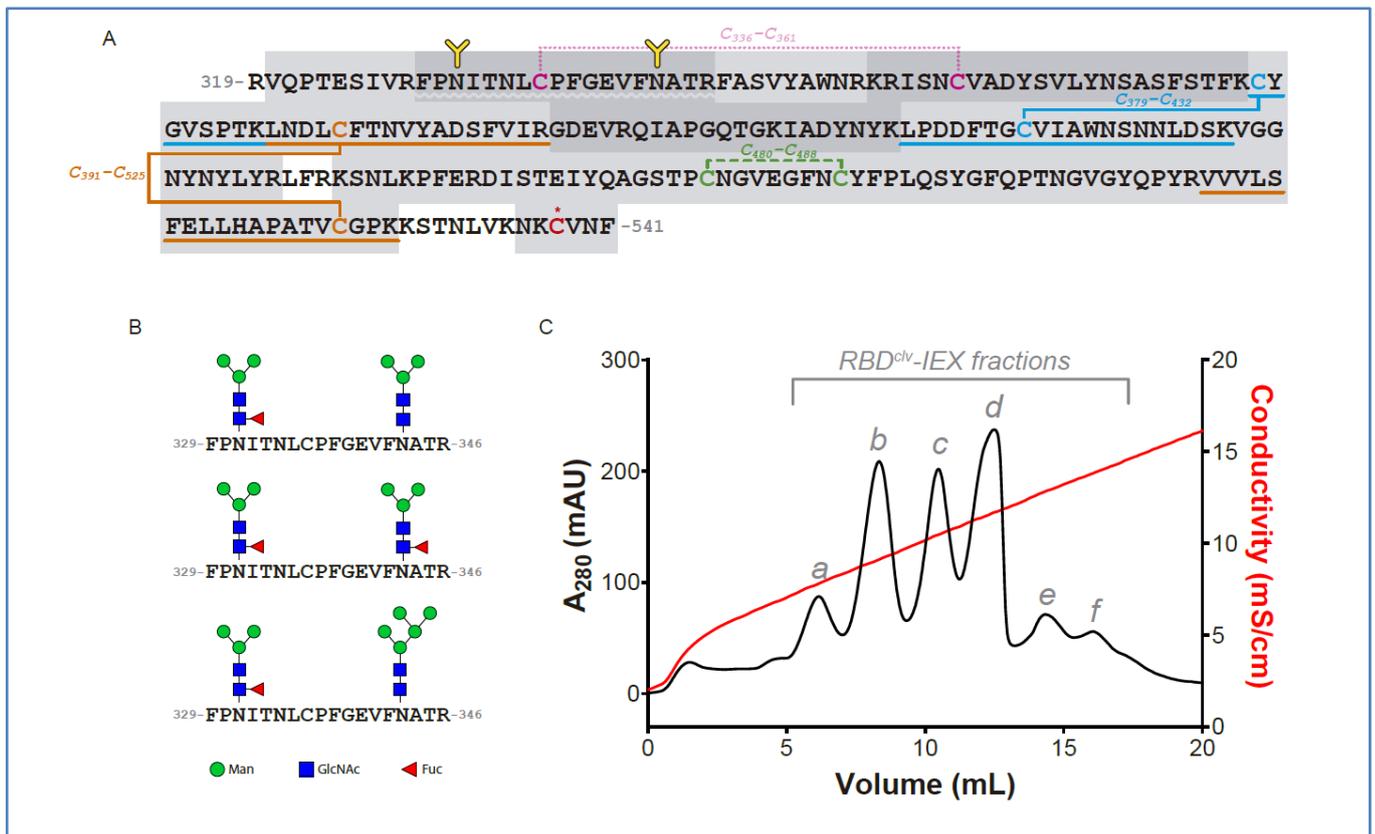
**Tabla 2: Análisis de la unión RBD-shACE2 medido por SPR.** Parámetros cinéticos obtenidos en tres experimentos de SPR independientes, realizados mediante captura de shACE2-ST (a tres densidades diferentes) e inyección secuencial de RBD<sup>clv</sup> a diferentes concentraciones. La **Figura 10.B** se preparó con los datos del experimento #1 y los parámetros globales que describen la interacción se obtuvieron a partir de la media y la desviación estándar calculadas con los datos de tres experimentos independientes (*en negrita*).

| Experimento                              | $k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | $R_{MAX}$ (RU) | $K_D$ (M)       | Chi <sup>2</sup> |
|------------------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| RBD <sup>clv</sup> vs shACE2-ST (exp #1) | 9,20E+05                     | 6,90E-03               | 10,1           | 7,5E-09         | 0,205            |
| RBD <sup>clv</sup> vs shACE2-ST (exp #2) | 7,95E+05                     | 6,81E-03               | 16,8           | 8,6E-09         | 0,150            |
| RBD <sup>clv</sup> vs shACE2-ST (exp #3) | 7,88E+05                     | 6,93E-03               | 21             | 8,8E-09         | 0,281            |
| <b>Media</b>                             | <b>8,34E+05</b>              | <b>6,88E-03</b>        |                | <b>8,29E-09</b> |                  |
| <b>SD</b>                                | <b>7,43E+04</b>              | <b>6,24E-05</b>        |                | <b>6,92E-10</b> |                  |

Por último, llevamos a cabo ensayos tipo ELISA para demostrar la funcionalidad de las glicoproteínas en ensayos serológicos. Por un lado evidenciamos que RBD<sup>clv</sup> es reconocido con alta especificidad por sueros humanos de individuos infectados en forma natural (**Figura 10.D**), tal como se observó previamente (Amanat et al., 2020; Rammauro et al., 2022). Estos resultados demuestran la idoneidad de esta proteína como antígeno en pruebas ELISA de tipo indirecto destinadas a medir seroconversión y niveles de anticuerpos contra SARS-CoV-2. Por otro lado, realizamos un ELISA de competición inmovilizando RBD<sup>clv</sup> e incubando shACE2-ST en presencia de sueros positivos y negativos a SARS-CoV-2. Estos resultados evidencian la capacidad de los anticuerpos específicos para bloquear la interacción entre RBD<sup>clv</sup> y shACE2-ST (**Figura 10.E**), resultando una prueba de concepto para su utilización en pruebas sVNTs (*surrogate Virus Neutralization Tests*) que permitan evidenciar la actividad neutralizante de sueros humanos (obviando las restricciones técnicas de los PRNTs y pseudovirus).

### 2.3.4. EL RBD PRODUCIDO EN S2 PRESENTA MICRO-HETEROGENEIDAD ASOCIADA PRINCIPALMENTE A PRESENCIA DE GLICANOS Y CARGAS NEGATIVAS

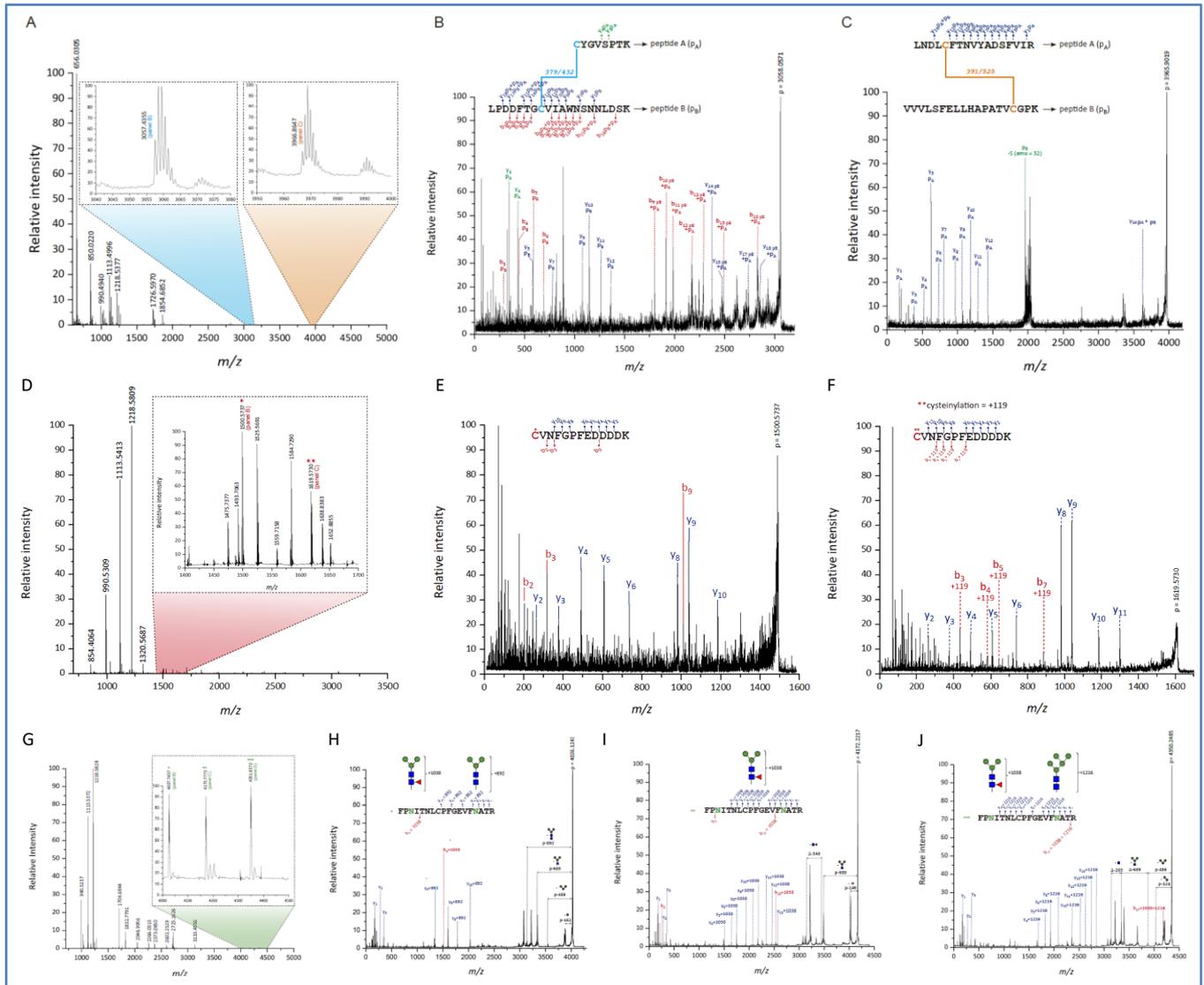
El análisis proteómico de RBD-ST por MALDI-TOF/TOF permitió identificar directamente tres de los cuatro puentes disulfuro presentes en la construcción (**Figura 11.A**).



**Figura 11: Micro heterogeneidad de la RBD.** **A)** La secuencia aminoacídica de la RBD se muestra con números grises que indican la posición de los residuos N- y C-terminales (por claridad, las secuencias de corte por EK y el *Strep-tag* fueron omitidas). Los enlaces disulfuro se muestran como cisteínas (C) unidas por conectores rectos, identificados con un código de color único para cada par, junto con las posiciones de cada cisteína involucrada. Los péptidos identificados por MALDI-TOF/TOF en condiciones no reductoras se identifican en gris claro. Las secuencias marcadas con recuadros de color gris oscuro destacan aquellos péptidos identificados exclusivamente en RBD-ST reducido/alquilado. El disulfuro representado con una línea verde discontinua se identificó como un enlace intrapéptido, los identificados con conectores continuos azul claro y naranja se identificaron como péptidos entrecruzados (**Figura 12.A-C**) y el disulfuro identificado con líneas de puntos (magenta pálido) no pudo identificarse directamente mediante el análisis MALDI-TOF/TOF. La C<sub>538</sub> no apareada se muestra en rojo con un asterisco. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran con una Y amarilla sobre los residuos de asparagina (N<sub>331</sub> y N<sub>343</sub>) mientras que el glicopéptido correspondiente (entre 329 y 346) se subraya con una línea ondulada gris claro. **B)** El glicopéptido 329-346 se identificó mediante MALDI-TOF/TOF con modificaciones del N-glicano en N<sub>331</sub> y N<sub>343</sub>. (**Figura 12.G-J**). **C)** Cromatografía preparativa de intercambio iónico (IEX) de RBD<sup>div</sup> mostrando la presencia de especies cargadas diferencialmente. Cada una se nombra con las letras a-f en texto gris sobre cada pico.

El ion correspondiente al puente intrapéptido (C<sub>480</sub>-C<sub>488</sub>) fue detectado directamente del espectro MS ( $m/z=x$ ), mientras que las cisteínas presentes en péptidos enlazados por puentes disulfuro (C<sub>379</sub>-C<sub>432</sub> y C<sub>391</sub>-C<sub>525</sub>) se confirmaron mediante fragmentación y análisis MS/MS (**Figura 12.A-C**). Por su parte, el residuo C<sub>538</sub> (que forma un disulfuro con un dominio de Spike ausente en nuestra construcción) sólo se detectó en forma reducida o cisteinilada (**Figura 12.D-F**), pero nunca formando enlaces con otras cisteínas.

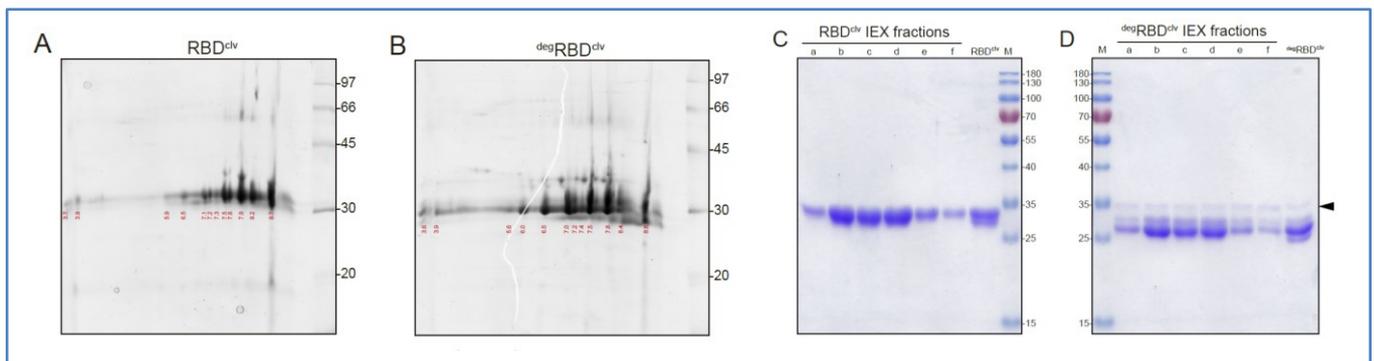
Los péptidos que contienen los restantes residuos C<sub>336</sub> y C<sub>361</sub> (enlazados por el puente disulfuro que no pudo ser detectado en forma directa) sólo lograron identificarse tras un tratamiento de reducción/alquilación, exclusivamente cuando se incluyeron en las búsquedas diferentes combinaciones de N-glicanos paucimanosídicos y ricos en manosa en los residuos identificados como potenciales sitios de N-glicosilación (N<sub>331</sub> y N<sub>343</sub>) (Figura 11.B, Figura 12.G-J).



**Figura 12: Identificación de péptidos por MALDI-TOF/TOF.** A-C) Espectro de masas de la digestión trípica de RBD<sup>clv</sup>, con recuadros que muestran zonas amplificadas de m/z=3040 a 3080 (en azul claro) y de m/z=3950 a 4000 (en naranja) correspondientes a péptidos enlazados por puentes disulfuro (A). Los picos correspondientes fueron fragmentados e inspeccionados en forma manual, asignándose señales que permiten identificar los fragmentos iónicos de los péptidos unidos covalentemente por puentes disulfuro (B-C). D-F) Espectro de masas de la digestión trípica de RBD<sup>clv</sup>, con recuadros que muestran zonas amplificadas de m/z=1400 a 1700 (en rojo) con señales de masa que no pudieron asignarse a la secuencia RBD<sup>clv</sup> y que se denotan con uno (MH+ = 1500,6) y dos asteriscos rojos (MH+= 1619,6) (D). Se obtuvieron espectros de fragmentación MS/MS y tras su inspección manual se asignaron señales que permitieron confirmar el péptido trípico 538CVNFGPFEDDDK<sub>550</sub> en su forma nativa (E) y en su forma cisteinilada (F). Los iones b indicados con +119 denotan la detección de la adición de la cisteinilación. G-J) Ejemplos de detección de N-glicosilación en RBD mediante análisis MALDI-TOF/TOF. Espectro de masas de la digestión trípica de RBD<sup>clv</sup>, con un recuadro que muestran zonas amplificadas de señales MH+= 4027, MH+ = 4174 y MH+ = 4352 (G). La fragmentación por MS/MS e inspección manual permite la asignación de los iones para identificar el péptido 329FPNITNLCPFGEVFNATR<sub>346</sub> con la incorporación del glicano FM3 [+1038] en N<sub>331</sub> y los glicanos M3 [+892] (I), FM3 [+1038] y M5 [+1216] en N<sub>343</sub> (H-J).

Estos resultados sugieren que la presencia de N-glicanos en esta región de RBD es responsable de la imposibilidad para detectar en forma directa estos péptidos enlazados por puentes disulfuro. Además, representan un indicio de la alta tasa de glicosilación de dichos sitios.

Por otro lado, se realizó un análisis de RBD<sup>clv</sup> por electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE), mostrando numerosos “spots” con punto isoeléctrico variable e inferior a su valor teórico (pI=8,5) (**Figura 13.A-B**). La remoción de N-glicanos mediante tratamiento con PNGaseF evidenció una reducción del tamaño de la proteína resultante (<sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup>) y un aumento relativo de la intensidad de las especies más ácidas (probablemente como consecuencia de la deamidación de asparaginas deglicosiladas). Sin embargo, la micro heterogeneidad por cargas negativas fue evidente en ambas proteínas, sugiriendo que su origen es independiente de la micro heterogeneidad por N-glicanos.



**Figura 13: Micro-heterogeneidad de carga de RBD. A-B)** Análisis por 2D-SDS-PAGE de RBD<sup>clv</sup> y <sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup>, respectivamente, con los puntos isoeléctricos (pI) calculados para diferentes spots (en rojo). **C-D)** Análisis por SDS-PAGE con tinción Coomassie a partir de fracciones de RBD<sup>clv</sup> eluidas a partir de una cromatografía de intercambio iónico (IEX) preparativa antes y después del tratamiento con PNGaseF. También se incluyeron RBD<sup>clv</sup> y <sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup> (pre-IEX) como control. La punta de flecha indica la banda correspondiente a la PNGasa F.

Utilizamos cromatografía de intercambio iónico (IEX) para confirmar la micro heterogeneidad de cargas, obteniendo varias fracciones de RBD<sup>clv</sup> (identificadas con letras *a-f*), que eluyeron diferencialmente en un gradiente de concentración salina (**Figura 11.C**). La N-deglicosilación de todas las fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX (*a-f*) mostraron el mismo desplazamiento electroforético en SDS-PAGE, sugiriendo que la presencia de N-glicanos está homogéneamente distribuida a lo largo de todas las fracciones IEX y por lo tanto no estrictamente ligada a micro heterogeneidad de cargas (**Figura 13.C-D**).

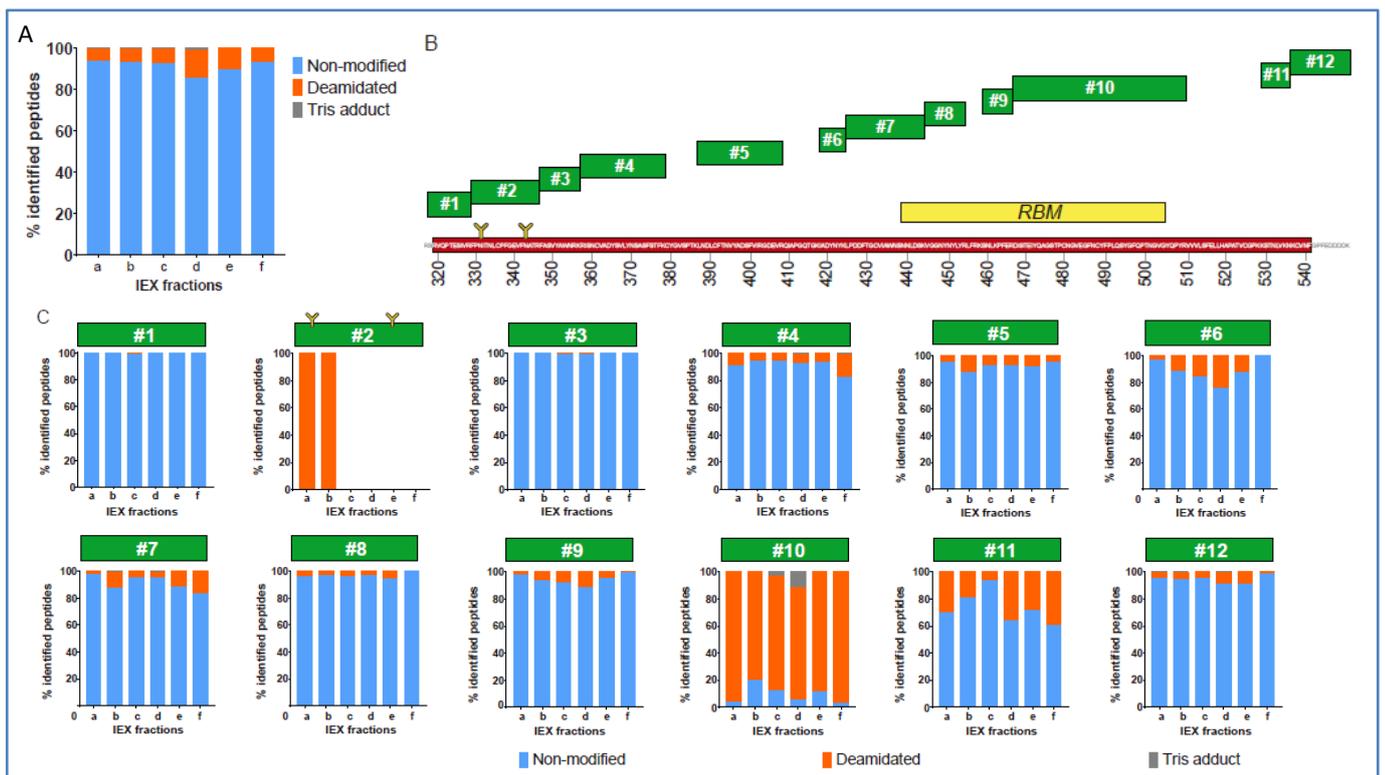
Con el propósito de lograr la mayor cobertura de secuencia posible, se procedió a reducir/alquilar de manera secuencial las fracciones *a-f* de RBD<sup>clv</sup>-IEX y sus homólogos deglicosiladas (<sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup>-IEX) para ser luego sometidas a análisis por nano-HPLC MS/MS. Como se observó anteriormente por MALDI-TOF/TOF, la secuencia no modificada del péptido 329-346 de RBD<sup>clv</sup> no pudo ser identificada en ningún caso (**Tabla**

**Suplementaria 1**), sugiriendo que este péptido se encuentra altamente modificado. Paralelamente, identificamos este péptido en todas las fracciones de  $^{deg}RBD^{clv}$ -IEX que contenían residuos de asparagina ( $N_{331}$  y  $N_{343}$ ) deamidados (**Tabla Suplementaria 2**) terminando de demostrar que la alta tasa de modificación de este péptido en todas las fracciones IEX se debe a la presencia de N-glicanos. Los “scans” correspondientes al péptido 329-346 doblemente deamidado representaron el 91%, mientras que la desamidación en una sola asparagina correspondió al 0,2% y al 8,8% para  $N_{331}$  y  $N_{343}$ , respectivamente (**Tabla Suplementaria 3**). Estos resultados muestran que la ocupación de N-glicanos en los sitios predichos es alta, con  $N_{331}$  menos glicosilada que  $N_{343}$ , como se ha visto con RBD expresada en células humanas y de insectos (Bagdonaite et al., 2021; Sanda et al., 2021).

En cuanto a las versiones del péptido 329-346 monoglicosilado, identificamos N-glicanos paucimanosídicos y ricos en manosa sólo en  $N_{343}$  (**Tabla Suplementaria 4**), probablemente debido a la mayor ocupación mencionada anteriormente. Curiosamente no fuimos capaces de identificar dicho péptido en su forma doblemente glicosilada (con ninguno de los glicanos previamente identificados por MALDI-TOF/TOF). Una posible explicación para esto radicaría en su menor eficacia de ionización y a su elevada hidrofiliidad (por la presencia de glicanos solubles), que impide su unión a las columnas de fase reversa utilizadas (Kozlik et al., 2017). Basándonos en esto, proponemos que las formas monoglicosiladas de este péptido constituyen una fracción poco frecuente, pero que puede ayudarnos a dilucidar qué motivos glucídicos son más abundantes en la RBD expresada en células S2, sin descartar la existencia de motivos con mayor contenido en manosa.

En cuanto a la O-glicosilación, también se identificaron glicanos de tipo Tn y Core 1 en  $^{deg}RBD^{clv}$  mediante nano-HPLC MS/MS. Las O-glicosilaciones más frecuentes se identificaron en residuos de Treonina pertenecientes a secuencias canónicas de N-glicosilación ( $T_{333}$  y  $T_{345}$ ), casi exclusivamente cuando el residuo de asparagina precedente no se encontraba deamidado (y por ende se trata de un residuo no modificado con N-glicanos). Estos resultados sugieren que la O-glicosilación en estas posiciones ocurre en ausencia de N-glicanos, apoyando la hipótesis de que los O-glicanos podrían estar enmascarando potenciales N-glicositos inusualmente desocupados en la RBD expresada en células S2 (Bagdonaite et al., 2021). En paralelo, se identificaron O-glicanos de tipo Core-1 en  $T_{323}$  y  $S_{325}$  (con el doble de frecuencia que Tn), como se ha señalado en células humanas (Eldrid et al., 2021; Shajahan et al., 2020; Watanabe et al., 2020) e insectos (Bagdonaite et al., 2021). También se identificaron O-glicanos en otras regiones de RBD aunque con frecuencias muy bajas (**Tabla Suplementaria 5**). Nuestra caracterización de los glicanos de la RBD expresada en células de insecto S2 coincide plenamente con la de Bagdonaite et al. (Bagdonaite et al., 2021) quienes utilizaron un sistema de expresión de su propiedad con secuencias accesorias diferentes.

Por completitud buscamos modificaciones postraduccionales (PTMs) que pudieran explicar la micro heterogeneidad por cargas negativas de RBD. La incorporación de glicanos conteniendo ácido siálico es la principal fuente de micro heterogeneidad por cargas negativas en glicoproteínas de origen eucariota, sin embargo la sialilación es rara en las células de insecto (Harrison & Jarvis, 2006) y no fue encontrada en nuestras búsquedas. Encontramos deamidación espontánea de residuos de asparagina en todas las fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX (**Figura 14.A**), siendo el péptido que abarca aproximadamente la mitad de la secuencia RBM (péptido #10) el más frecuente (**Figura 14.B-C**).



**Figura 14: Efecto de la desamidación espontánea y aductos de Tris sobre la micro heterogeneidad de las cargas negativas de RBD<sup>clv</sup> analizadas por LC-MS/MS.** A) Análisis comparativo del número de péptidos no modificados, desamidados y con aductos de Tris, a lo largo de diferentes fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX. B) Secuencia RBD<sup>clv</sup> (recuadro rojo) con sitios de N-glicosilación putativos (Y amarilla), RBM (recuadro amarillo) y péptidos trípticos que contienen residuos de asparagina numerados del #1 al #12 (recuadros verdes). C) Diagramas correspondientes a cada péptido tríptico (identificados con recuadros verdes numerados del 1 al 12 en la parte superior) que muestran el porcentaje de modificación identificado por MS/MS nano-HPLC a lo largo de las fracciones IEX (como en A). Los péptidos sin residuos N no se tuvieron en cuenta (gaps en B). El péptido #2 no se identificó en ningún caso como péptido "no modificado" debido a la alta ocurrencia de N-glicosilación con unos pocos péptidos desamidados (en las fracciones a y b) que representaron el 100% de los péptidos identificados en esta posición.

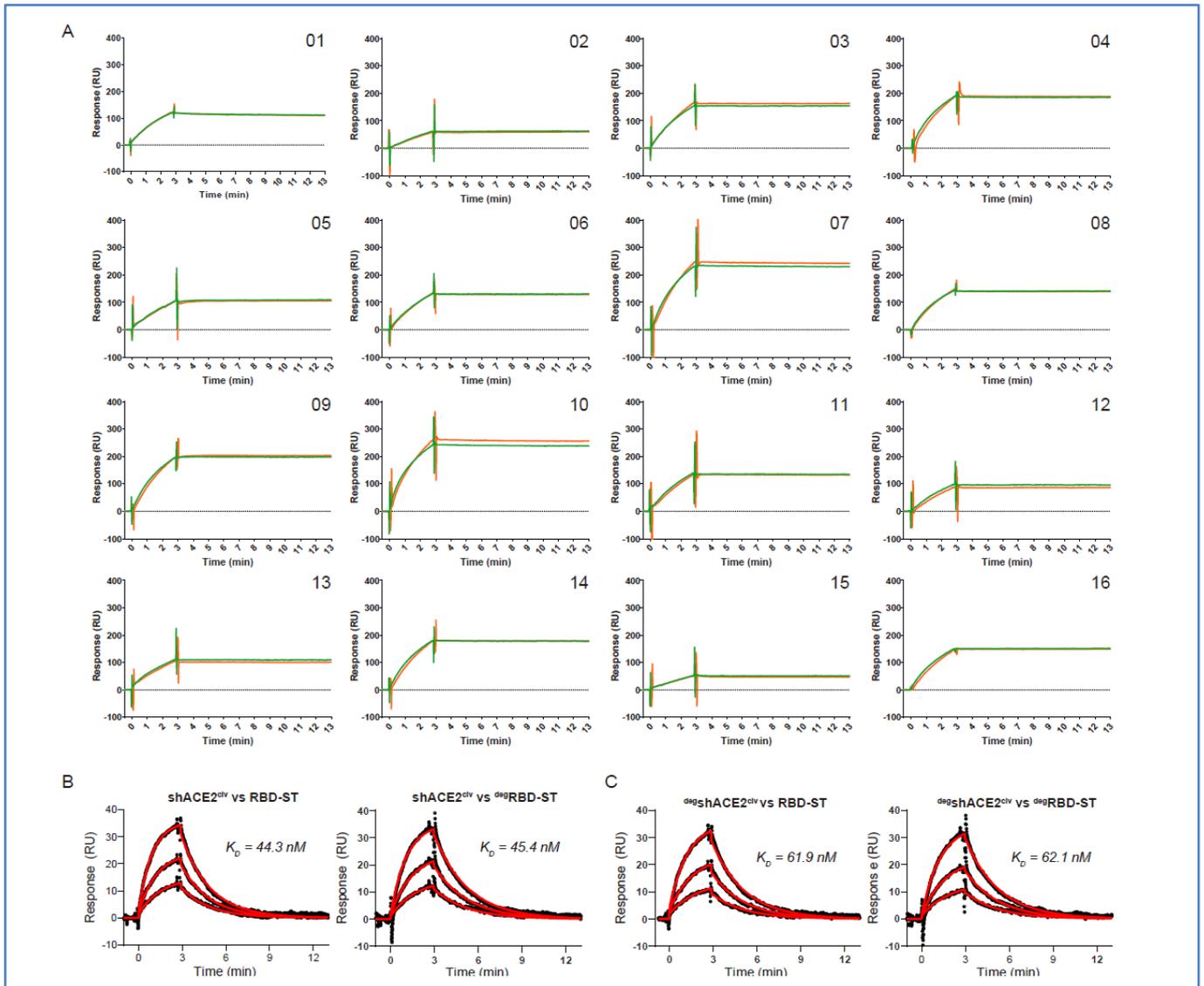
Sin embargo, al no encontrar una correlación entre la frecuencia de deamidación espontánea y la cantidad de cargas negativas, fue imposible atribuirlo exclusivamente a su ocurrencia. Además, los aductos de Tris en los residuos de asparagina (y glutamina) deamidados (que podrían estar modificando aún más estos residuos de asparagina (Kabadi et al., n.d.) y afectando a su identificación) se mantuvieron como una fracción muy marginal (0,1-1,3%) en todas las fracciones de IEX (**Figura 14.A, Tabla Suplementaria 6**). La deamidación de la asparagina a aspartato (o iso-aspartato) conlleva cambios en la carga total (así como en la cadena principal de las proteínas) y ha sido asociada con el envejecimiento de la proteína *Spike* de

betacoronavirus, describiéndose el RBM como un punto caliente de deamidación (Lorenzo et al., 2021). Nuestros resultados sugieren que la deamidación espontánea del RBD expresado en células S2 es responsable de la presencia de cargas negativas (principalmente en el RBM); sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado, no fuimos capaces de identificar un conjunto de modificaciones que expliquen exclusivamente la micro heterogeneidad por cargas negativas y se necesitan estudios adicionales para completar esta información.

### 2.3.5. LA MICRO-HETEROGENEIDAD DEL RBD NO AFECTA SU FUNCIONALIDAD IN VITRO

En el virión, la glicosilación de Spike decora su superficie dificultando su detección por parte del sistema inmune e incluso promueve cambios conformacionales que facilitan la exposición de residuos del RBM para que establezca contactos moleculares con el receptor hACE2 (Casalino et al., 2020; Zhao et al., 2020). Sin embargo, estas funciones de los glicanos pierden relevancia cuando RBD es expresado como dominio aislado (Gstöttner et al., 2021) y utilizado *in vitro* como en nuestro caso. Para confirmarlo, llevamos a cabo experimentos de SPR con versiones glicosiladas y deglicosiladas de RBD-ST, para comparar el reconocimiento específico por un conjunto de sueros de individuos vacunados, no evidenciando diferencias significativas (**Figura 15.A, Tabla Suplementaria 6**).

También utilizamos esta técnica para evaluar el efecto de la N-glicosilación sobre la interacción RBD-shACE2, inyectando simultáneamente shACE2<sup>clv</sup> (o <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup>) sobre RBD-ST y <sup>deg</sup>RBD-ST capturados sobre dos superficies en paralelo. A lo largo de esta tesis, evitamos la utilización de shACE2<sup>clv</sup> como analito en los experimentos SPR, ya que la afinidad resulta subestimada, probablemente debido a interacciones no específicas con la superficie del chip. Sin embargo, en este caso, este abordaje nos permitió detectar con precisión las diferencias en la unión utilizando virtualmente una misma inyección de analito para evaluar la interacción con ambas versiones de RBD (glicosilado y deglicosilado), evitando así sesgos de cuantificación de proteínas. Si bien los resultados mostraron diferencias con los resultados obtenidos por ITC y SPR utilizando RBD<sup>clv</sup> como analito, las afinidades de unión permanecieron invariables a pesar de la deglicosilación de la RBD-ST capturada (**Figura 15.B-C, Tabla 3**), demostrando así que la N-glicosilación tampoco afecta su unión al receptor en concordancia con reportes previos (Sun et al., 2020).



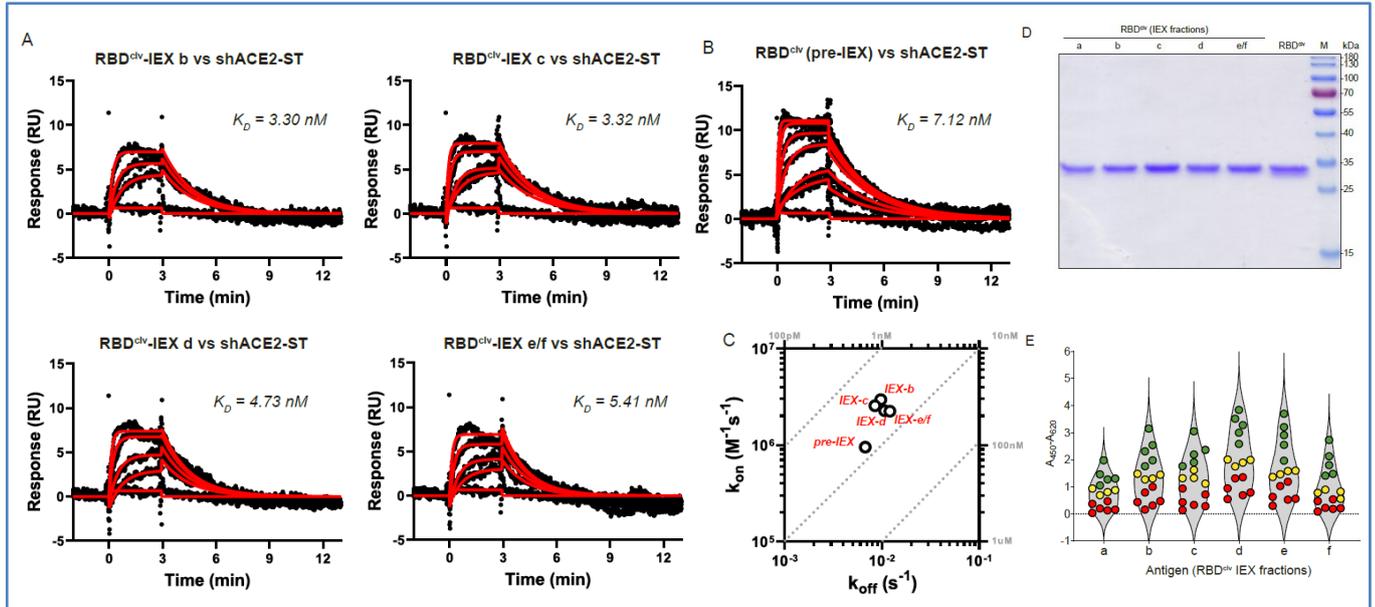
**Figura 15: Efecto de la N-glicosilación del RBD en la antigenicidad y su unión a shACE2.** **A)** Análisis por SPR de unión entre anticuerpos séricos de 16 individuos vacunados (identificados con los números 1-16) y los RBD-ST capturados en su versión glicosilada (trazo verde) o <sup>deg</sup>RBD-ST (trazo naranja). Los sensorgramas se obtuvieron tras la substracción de la respectiva muestra de suero preinmune. **B)** Análisis por SPR entre shACE2<sup>clv</sup> inyectado sobre RBD-ST capturado (*izquierda*) y <sup>deg</sup>RBD-ST capturado (*derecha*). **C)** Análisis por SPR entre <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup> inyectado sobre RBD-ST capturado (*izquierda*) y <sup>deg</sup>RBD-ST (*derecha*). Todos los experimentos de SPR se realizaron en paralelo utilizando la misma inyección de analito. Los valores de  $K_D$  mostrados en cada panel se obtuvieron tras el ajuste a un modelo Langmuir 1:1 (trazos rojos).

**Tabla 3: Efecto de la deglicosilación en la interacción RBD-shACE2 analizada mediante análisis SPR.** Parámetros cinéticos obtenidos en cuatro experimentos de SPR diferentes, realizados mediante captura de RBD-ST y <sup>deg</sup>RBD-ST en dos superficies paralelas, e inyecciones secuenciales de shACE2<sup>clv</sup> y <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup> a concentraciones variables (12,5, 25 y 50 nM). Los datos se ajustaron a al modelo de interacción Langmuir 1:1.

| Experimento                                                   | $k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | $R_{MAX}$ (RU) | $K_D$ (M) | $\chi^2$ |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------|-----------|----------|
| shACE2 <sup>clv</sup> vs RBD-ST                               | 1,92E+05                     | 8,50E-03               | 61,5           | 4,43E-08  | 0,308    |
| shACE2 <sup>clv</sup> vs <sup>deg</sup> RBD-ST                | 1,59E+05                     | 7,23E-03               | 64,7           | 4,54E-08  | 0,427    |
| <sup>deg</sup> shACE2 <sup>clv</sup> vs RBD-ST                | 1,21E+05                     | 7,47E-03               | 71             | 6,19E-08  | 0,310    |
| <sup>deg</sup> shACE2 <sup>clv</sup> vs <sup>deg</sup> RBD-ST | 1,17E+05                     | 7,24E-03               | 74,2           | 6,21E-08  | 0,313    |

Para completar nuestra caracterización del RBD, nos centramos en estudiar el efecto de la microheterogeneidad por cargas negativas sobre su unión con shACE2 y anticuerpos séricos específicos.

En primer lugar, realizamos experimentos SPR inyectando fracciones RBD<sup>clv</sup>-IEX sobre shACE2-ST capturado, obteniendo incluso valores de afinidad sutilmente superiores con respecto a los experimentos control (con RBD<sup>clv</sup> pre-IEX). Este aumento de la afinidad se explica principalmente por la obtención de valores de constantes cinéticas de asociación ( $k_{on}$ ) más rápidas, al tiempo que las constantes cinéticas de disociación prácticamente no ofrecieron diferencias (Figura 16.A-C, Tabla 4).



**Figura 16: Efecto de la micro heterogeneidad de las cargas negativas de RBD en la unión con shACE2 y la antigenicidad.** A-B) Análisis por SPR de la interacción entre shACE2-ST capturado sobre la superficie del chip y diferentes RBD<sup>clv</sup> provenientes de fracciones de IEX (A) y un control sin someter a intercambio iónico, pre-IEX (B). Las fracciones e y f fueron agrupadas e identificadas como fracción e/f. Todos los sensorgramas se ajustaron a un modelo de Langmuir 1:1 (trazos rojos) con los respectivos valores de  $K_D$  mostrados en cada panel. C) Gráfico bidimensional de isoafinidad para comparar los parámetros cinéticos obtenidos por SPR en A y B. Con líneas grises punteadas se delimitan las zonas de isoafinidad (con sus valores indicados en gris, sobre los ejes). D) Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie de las fracciones RBD<sup>clv</sup>-IEX tras ser sometidas a cambio de buffer, concentración y la cuantificación de proteínas. E) Diagrama de violín de un ELISA realizado con un conjunto de sueros positivos al SARS-CoV-2 (procedentes de individuos infectados), utilizando diferentes fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX como antígeno. Para mayor claridad, las muestras de suero individuales fueron arbitrariamente estratificadas de acuerdo con los títulos de anticuerpos cuantificados utilizando un método serológico comercial.

**Tabla 4: Efecto de la micro heterogeneidad de las cargas negativas en la interacción RBD-shACE2 analizada mediante SPR.** Parámetros cinéticos obtenidos en cuatro experimentos SPR diferentes realizados mediante captura de shACE2-ST e inyecciones secuenciales de diferentes fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX a concentraciones variables (5, 10, 25 y 50 nM). El experimento de control se realizó de forma similar inyectando RBD<sup>clv</sup> no sometido a IEX (pre-IEX) a concentraciones variables (5, 10, 25, 50, 100 y 200 nM). Los datos se ajustaron con un modelo de Langmuir 1:1.

| Experimento                               | $k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | $R_{MAX}$ (RU) | $K_D$ (M) | $\chi^2$ |
|-------------------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------|-----------|----------|
| RBD <sup>clv</sup> -IEX b vs shACE2-ST    | 2,96E+06                     | 9,77E-03               | 8,31           | 3,30E-09  | 0,239    |
| RBD <sup>clv</sup> -IEX c vs shACE2-ST    | 2,56E+06                     | 8,51E-03               | 8,60           | 3,32E-09  | 0,267    |
| RBD <sup>clv</sup> -IEX d vs shACE2-ST    | 2,27E+06                     | 1,07E-02               | 8,37           | 4,73E-09  | 0,313    |
| RBD <sup>clv</sup> -IEX e/f vs shACE2-ST  | 2,24E+06                     | 1,21E-02               | 8,58           | 5,41E-09  | 0,519    |
| RBD <sup>clv</sup> (pre-IEX) vs shACE2-ST | 9,46E+05                     | 6,74E-03               | 9,73           | 7,12E-09  | 0,187    |

Si tenemos en cuenta que el cálculo de las constantes cinéticas de disociación ( $k_{off}$ ) no depende de la concentración inicial de analito y que la cromatografía de intercambio iónico implica un paso de purificación adicional para dar lugar a fracciones más puras (**Figura 16.D**), es probable que las ligeras diferencias en las afinidades calculadas estén relacionadas con la purificación/cuantificación de proteínas más que con características propias de las mismas. Independientemente de esta observación, nuestros resultados demuestran que la micro heterogeneidad de RBD debido a cargas negativas no tiene ningún efecto perjudicial sobre su unión con shACE2.

Por último, inmovilizamos las fracciones RBD<sup>clv</sup>-IEX en placas de ELISA y analizamos su antigenicidad con un conjunto de sueros positivos para SARS-CoV-2 con título variable. A pesar de no descartar diferencias en la respuesta debido a la estabilidad de la proteína tras la inmovilización, nuestros resultados demuestran que todas las fracciones RBD<sup>clv</sup>-IEX presentan antigenicidad con resultados comparables (**Figura 16.E**).

## 2.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestro trabajo describe un protocolo único, simple y accesible para producir versiones solubles del RBD de SARS-CoV-2 y su receptor celular ACE2, utilizando células S2 de *Drosophila*.

Demostramos que ambas proteínas se producen con altos rendimientos, dando lugar a versiones solubles, estables y funcionales con capacidad de interactuar *in vitro*. Además, optimizamos un protocolo para remover el *Strep-tag* sin afectar su estabilidad y funcionalidad, permitiendo su utilización para múltiples aplicaciones como inmovilización, marcado con fluorescencia, fusión a enzimas colorimétricas, etc.

Respecto a la producción del RBD de SARS-CoV-2 en células S2, encontramos micro heterogeneidad causada principalmente por variaciones en el patrón de glicosilación y por presencia de cargas negativas. Sin embargo, su efecto sobre la unión con ACE2 y anticuerpos específicos resulta despreciable, posicionando nuestro sistema como una alternativa fiable para emular la interfase virus-célula *in vitro*.

Dado que nuestro trabajo se limita al RBD de la variante ancestral Wuhan, resulta necesario extenderlo a otras variantes de SARS-CoV-2. Además, deberían estudiarse las PTMs de la shACE2 producidas en células S2, con el fin de completar la caracterización de nuestro sistema.

El origen de la micro heterogeneidad de cargas de RBD permanece elusivo a pesar de nuestros esfuerzos, y resulta fundamental continuar trabajando en esta línea y extender su búsqueda a proteínas virales nativas o formulaciones inmunogénicas obtenidas en otros sistemas de expresión.

Dados los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que RBD/shACE2 expresados en células S2 pueden ser utilizados en el diseño de ensayos serológicos y que su implementación podría otorgar soberanía en la toma de decisiones sobre la administración de nuevas dosis de refuerzo de SARS-CoV-2, principalmente en el contexto de acceso limitado a laboratorios BSL3. Además, nuestra caracterización biofísica y bioquímica de las proteínas expresadas en células S2 apoya firmemente su idoneidad en este tipo de aplicaciones y como antígenos para evaluar respuesta humoral frente a infección y vacunas.

La funcionalidad y antigenicidad mostrada por el RBD producido en células S2, sumado a los excelentes rendimientos y facilidad de producción permitieron su aplicación en el desarrollo y fabricación de kits serológicos a través de una alianza entre el Institut Pasteur de Montevideo, la Universidad de la República y la empresa ATGen. Dicho antígeno fue utilizado para producir dos kits diferentes con capacidad para detectar (kit COVID-19 IgG ELISA UY 2.0) y cuantificar (kit COVID-19 IgG QUANT ELISA) IgG específicas en muestras de suero humano. Dichos kits fueron registrados y autorizados por el MSP (Anexo, pág. 192), y su utilización en el territorio permitió realizar múltiples estudios serológicos en la población uruguaya.

El kit COVID-19 IgG ELISA UY 2.0 (semicuantitativo) se utilizó con la intención de identificar individuos infectados asintomáticos o sin diagnóstico previo. En esta línea, se realizaron estudios de seroprevalencia a nivel de personal de salud (un estudio en la ciudad de Rivera y otro a nivel nacional). También se hicieron estudios de seroprevalencia a nivel de población general en relación con brotes de SARS-CoV-2 (en la ciudad de Salto) y también en individuos sanos, previo al inicio de la vacunación (uno en la ciudad de Rivera a partir de un muestro estadísticamente representativo y otro a nivel de trabajadores del Institut Pasteur de Montevideo). Este kit semicuantitativo se utilizó también en muestras de plasma de pacientes recuperados, con el objetivo de recabar datos para conformar un banco de plasma con potencial terapéutico (Rammauro, 2023).

Por su parte, el kit COVID-19 IgG QUANT ELISA (cuantitativo) se utilizó principalmente para estudiar la respuesta a la vacunación heteróloga en individuos inmunosuprimidos receptores de trasplantes sólidos (Prieto et al., 2022; Seija et al., 2023; Seija, Rammauro, Noboa, et al., 2022; Seija, Rammauro, Santiago, et al., 2022) y en una cohorte de individuos sanos del Institut Pasteur de Montevideo, el cual se describirá en el siguiente capítulo.

## 2.5. METODOLOGÍA

### 2.5.1. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Se utilizaron las secuencias de ADN que codifican los aminoácidos 319-541 de la glicoproteína Spike de SARS-CoV-2 (Wuhan) (GenBank: MN908947.3) y 18-615 de la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (hACE2) (GenBank: BAB40370. 1). Ambos dominios se diseñaron fusionados a un sitio de corte de enteroquinasa bovina en el extremo C-terminal, seguido de un Twin-Strep-tag® (IBA) y un codón STOP para dar lugar a las construcciones de RBD-ST y shACE2-ST (por soluble hACE2). Las secuencias fueron optimizadas para el uso de codones de *Drosophila melanogaster* y sintetizados por Genscript. Los genes sintéticos se clonaron en un vector de expresión pMT/V5-His (Invitrogen) inmediatamente después de la secuencia BiP, tal como se describió previamente (Krey et al., 2010) y se resume en la **Figura 4.A**.

### 2.5.2. PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Se obtuvieron líneas celulares S2 estables que expresan RBD-ST y shACE2-ST mediante co-transfección con el respectivo vector de expresión y un plásmido de selección a puromicina (pCoPuro) utilizando el reactivo Effectene (QIAGEN). Las células transfectadas se seleccionaron a 28°C en medio Insect Xpress (LONZA) complementado con 6 µg/mL de puromicina. Las líneas celulares S2 estables se cultivaron en matraces de vidrio a 28°C con agitación a 110 rpm en un agitador orbital estándar y se indujeron a 5x10<sup>6</sup> células/mL con 5 µM CaCl<sub>2</sub>. Tras cuatro días de inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 150 g durante 5 minutos, y ambas proteínas se purificaron desde el sobrenadante del cultivo por cromatografía de afinidad (AC). Para ello, el sobrenadante se centrifugó a 6.000 g, se filtró a través de 0,22 µm y se cargó en una columna Strep-Tactin®XT 4Flow® de 5mL (IBA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuando fue necesario, el Strep-tag se eliminó mediante incubación overnight a 25°C con enteroquinasa-His (Genscript) (a 20 U mg<sup>-1</sup>), seguido de diálisis extensiva en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl e incubación con Ni-Sepharose® (Cytiva) durante 2 horas. Finalmente, la muestra filtrada por 0,22 µm se sometió a un segundo paso de purificación por AC en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA (buffer de almacenamiento). Por último, las proteínas recombinantes se sometieron a cromatografía de exclusión molecular (SEC) en buffer de almacenamiento, utilizando columnas Superdex 75 y 200 (Cytiva) para RBD-ST/RBD<sup>clv</sup> y shACE2-ST/shACE2<sup>clv</sup>, respectivamente.

## 2.5.3. ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO

### 2.5.3.1. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Las proteínas purificadas se sometieron a SDS-PAGE al 12% (con DTT 0,1M cuando fue necesario) y se analizaron posteriormente mediante tinción con Coomassie o *western blot* utilizando Streptactin-HRP (IBA) según las recomendaciones del fabricante. Además, se realizó electroforesis bidimensional (de acuerdo con (Lima et al., 2011)) utilizando 100  $\mu\text{g}$  de RBD<sup>clv</sup> o <sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup>.

### 2.5.3.2. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Para evaluar el tamaño de las proteínas en solución se realizaron ensayos de SEC analítica con columnas Superdex 75 (10-300) y Superdex 200 (10-300) en buffer de almacenamiento, y el peso molecular fue estimado utilizando kits de calibración para alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) (Cytiva)

### 2.5.3.3. DISPERSION DINÁMICA DE LUZ

El radio hidrodinámico ( $R_H$ ) se analizó por dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un Zetasizer Nano S (Malvern). Las mediciones se realizaron por quintuplicado utilizando cubetas de cuarzo a 25°C.

## 2.5.4. ANALISIS DE TERMOESTABILIDAD

La termoestabilidad de las proteínas recombinantes se evaluó mediante fluorimetría diferencial de barrido en nanoescala (nanoDSF) en un Prometheus NT.48 (Nanotemper) y los valores de  $T_M$  para los procesos de desnaturalización y replegamiento se obtuvieron mediante calentamiento y enfriamiento secuenciales a velocidades controladas de 1°C/min entre 25-90 °C. Cuando fue necesario, las muestras se incubaron en un exceso de DTT (8000 veces mayor) durante 1 hora a 25°C y se midieron inmediatamente.

## 2.5.5. N-DEGLICOSILACIÓN

La N-deglicosilación de RBD y shACE2 se realizó en condiciones nativas incubando 200  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante con 1000 U de PNGaseF (NEB) a 25°C durante toda la noche o en condiciones desnaturalizantes a 37°C durante 1 hora siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## 2.5.6. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (IEX)

El buffer de las proteínas fue sustituido por 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM NaCl utilizando columnas PD-10 (Cytiva) y a continuación las muestras se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (IEX) usado

una columna MonoQ 5/50 (Cytiva) equilibrada dicho buffer. Las proteínas cargadas se eluyeron con 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl en un gradiente de 40 volúmenes de columna (CVs).

## **2.5.7. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)**

### **2.5.7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

La preparación de las muestras para MS se realizó con proteínas solubles o bandas de SDS-PAGE teñidas con Coomassie. Cuando fue necesario, se llevó a cabo un paso inicial de reducción/alquilación, como se ha descrito anteriormente (Rivera et al., 2020). La preparación de muestras a partir de bandas de SDS-PAGE para MALDI-TOF/TOF se realizó de acuerdo con (Rossello et al., 2017), mientras que para el análisis de las proteínas en solución se obtuvieron péptidos trípticos que fueron desalados mediante Tips C18 OMIX (Agilent). Para MALDI-TOF/TOF, la elución se realizó en placa, y para LC-MS/MS, los eluatos fueron secados al vacío y resuspendidos en ácido fórmico al 0,1%, como se ha descrito anteriormente (Olivero-Deibe et al., 2021).

### **2.5.7.2. MALDI-TOF/TOF**

Los péptidos trípticos se analizaron utilizando un MALDI-TOF/TOF 4800 (Abi Sciex). Los espectros se adquirieron en modo reflector y el análisis MS/MS se realizó para los iones seleccionados. Las proteínas se identificaron mediante búsqueda en la base de datos NCBI (20160821) utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>) y los siguientes parámetros: tolerancia de masa monoisotópica: 0,03 Da; tolerancia de masa de fragmento: 0,5 Da; oxidación de metioninas como modificación variable, y carbamidometilación de cisteína como modificación fija (cuando corresponde). Además, se fragmentaron aquellas señales intensas, que no pudieron ser asignadas, para la posterior interpretación manual de modificaciones por N-glicosilación.

### **2.5.7.3. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS)**

Los péptidos trípticos se sometieron a LC-MS/MS como antes (Olivero-Deibe et al., 2021) utilizando un gradiente de fase móvil B de 0% a 35% durante 90 minutos, y el análisis de masas se realizó en modo "data-dependant" utilizando como se describió anteriormente (Rivera et al., 2020). Las búsquedas en bases de datos se realizaron con PatternLab V (Santos et al., 2022), utilizando una base de datos "target-decoy para *Drosophila melanogaster*" que incluye la secuencia RBD de Uniprot (junio de 2020). Los parámetros de búsqueda se enumeran en tablas suplementarias (ver ANEXO), y las coincidencias del espectro peptídico se filtraron para alcanzar un  $FDR \leq 1\%$  a nivel de proteína.

### **2.5.8. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA**

Los experimentos de ITC se realizaron en un VP-ITC (Malvern Panalytical) titulando shACE2-ST o shACE2<sup>clv</sup> 10  $\mu$ M con RBD<sup>clv</sup> o RBD-ST 150  $\mu$ M, respectivamente, en buffer de almacenamiento a 25°C. El análisis de los datos y el ajuste a un modelo de hetero-asociación se realizó como antes (Medeiros et al., 2020).

### **2.5.9. RESONANCIA DE PLASMÓNICA DE SUPERFICIE**

Los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore 3000 a 25°C con un flujo de 10  $\mu$ L/min. Como buffer de corrida se utilizó 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) P20, y los sensorchips fueron de tipo CM5 (Cytiva) previamente recubiertos con Twin-Strep-tag® Capture Kit (IBA), según las recomendaciones del fabricante. Todos los sensorgramas fueron doblemente referenciados y analizados con el software BIAevaluation v4.1.

Los análisis de unión se realizaron capturando shACE2-ST (a densidades entre 44 y 88 RUs) e inyectando RBD<sup>clv</sup> por triplicado a concentraciones entre 3-192 nM. Además, el efecto de la glicosilación sobre la unión se evaluó capturando RBD-ST (o <sup>deg</sup>RBD-ST) a densidades de 35 y 25 RUs, respectivamente, e inyectando shACE2<sup>clv</sup> (o <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup>) a concentraciones entre 12,5 y 50 nM.

Para estudiar el efecto de la deglicosilación de RBD sobre la unión con anticuerpos séricos se hicieron experimentos de SPR capturando RBD-ST y <sup>deg</sup>RBD-ST a densidades finales de 46 y 52 RUs en dos superficies paralelas e inyectando diluciones 1:50 de sueros de individuos obtenidos previo a la vacunación y 18 días después de recibir un esquema de vacunación heteróloga de tres dosis (2 dosis de CoronaVac + refuerzo con BNT162b) como se describe en el capítulo 3.

Para estudiar el efecto de la micro heterogeneidad de las cargas negativas de RBD sobre la unión con shACE2-ST inmovilizado, se capturaron densidades de ligando de 50 RUs y se inyectaron las fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX (*b*, *c*, *d*, y *e/f*) a concentraciones de 5, 10, 25, y 50 nM. Los experimentos de control con RBD<sup>clv</sup> pre-IEX se realizaron de forma idéntica con inyecciones adicionales de 100 y 200 nM.

### **2.5.10. ENSAYO DE UNIÓN A LA SUPERFICIE CELULAR**

Los ensayos de FACS se realizaron con adaptaciones al protocolo descrito anteriormente (Pallesen et al., 2017). Brevemente,  $1 \times 10^5$  células HEK293T y HEK293T-hACE2 (NR-52511, BEI Resources, NIAID, NIH) se incubaron en hielo durante 1 hora con diferentes cantidades de RBD-ST (entre 0,15 y 100 ng) y posteriormente se marcaron con 1:400 Streptactin-Dye 649 (IBA). Las células se adquirieron

inmediatamente utilizando un Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc.). Las células no teñidas se utilizaron como control del *background* de fluorescencia.

### 2.5.11. ELISA

La prueba ELISA se realizó con placas recubiertas con 200 ng de RBD<sup>clv</sup> o fracciones de RBD<sup>clv</sup>-IEX y fueron posteriormente incubadas con diluciones 1:100 de suero humano negativo (prepandémico), positivo (infección por SARS-CoV-2 confirmada por PCR) o vacunado (2 dosis de CoronaVac + refuerzo con BNT162b).

Para el ELISA de competición se utilizaron placas recubiertas con cantidades variables de RBD<sup>clv</sup> (0,0, 0,5, 1,0 y 2,0 microgramos por pocillo) y fueron posteriormente incubadas durante 1 hora a RT con una premezcla de concentraciones variables de shACE2-ST (0, 6, 12 y 24 µg/mL) y suero humano diluido 1:20 en PBS. Tras el lavado con PBS + 0,2% Tween 20, las placas se incubaron con Streptactina-HRP (IBA) diluido 1:1.000 y se revelaron con sustrato líquido TMB (Sigma) durante 15 minutos. La reacción colorimétrica se frenó con 50 µL de ácido sulfúrico 11% y las absorbancias a 450nm y 620nm se midieron en un lector de placas (Thermo) expresando los resultados como la sustracción de las medidas realizadas a ambas longitudes de onda.

Este estudio fue aprobado por la junta de revisión ética institucional (MSP\_956220-CEI\_001-2021). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

## CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL FRENTE A VACUNACIÓN HETERÓLOGAS

### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL

La infección por SARS-CoV-2 es a veces resuelta de manera bastante rápida y en otros lleva a complicaciones respiratorias que pueden terminar en la muerte del paciente. Diversos aspectos como la edad o patologías asociadas pueden incidir en dicho desenlace, no obstante la respuesta inmune desarrollada frente a la infección viral también puede tener implicancias graves. Los tipos y la magnitud de la respuesta inmune frente a SARS-CoV-2 son múltiples y variados, con diversos perfiles en cuanto a la severidad de la infección, lo cual requiere ahondar en los detalles para entender mejor ciertos aspectos que aún permanecen elusivos.

##### 3.1.1.1. RESPUESTA INNATA

El SARS-CoV-2 al igual que otros virus respiratorios ingresa al huésped venciendo la primera barrera de la inmunidad innata comprendida por las mucosas nasal, conjuntiva y oral. Los primeros mecanismos de la inmunidad innata son activados por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por *pathogen-associated molecular patterns*), que son reconocidos por receptores (PRRs, por *pattern-recognition receptors*) ubicados en la superficie e interior de las células del huésped. La detección de ARN de doble cadena en el interior de la célula (generado durante la replicación y transcripción del genoma del SARS-CoV-2) suele ser uno de los patrones reconocidos por los receptores endosómicos tipo Toll (TLR por *Toll-like receptors*) y citoplasmáticos RIG-I y MDA5, desencadenando una cascada de señales que redundan en la producción de citoquinas como los interferones de tipo I (INF- $\alpha/\beta$ ) que inducen un “estado antiviral” a nivel celular y sistémico. Este mecanismo de respuesta por INF tipo I, es uno de los principales mecanismos de respuesta innata antiviral, y en el caso de SARS-CoV-2 es inhibido y retrasado por diversas proteínas estructurales y no estructurales del virus (Lei et al., 2020). Otras citoquinas importantes son los interferones de tipo III, cuyos receptores se encuentran en células epiteliales de mucosas y representan

un mecanismo de defensa innata antiviral dirigido a virus respiratorios y gastrointestinales (Weber, 2020), los cuales son también bloqueados por proteínas del SARS-CoV-2 (Zheng et al., 2020).

Por su parte, otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$  se detectan en altos niveles en suero y plasma de pacientes infectados por SARS-CoV-2, lo cual ha sido asociado con severidad de la infección, dando lugar al concepto de “tormenta de citoquinas” acompañado de daño a nivel de tejido pulmonar con consecuencias graves para los pacientes en muchos casos.

El uso de anticuerpos monoclonales como *tocilizumab*, antagonista del receptor de IL-6 y aprobado para otras patologías, ha sido propuesto para contrarrestar la tormenta de citoquinas causada por SARS-CoV-2 en algunos casos graves (Amanat et al., 2020). Corticoesteroides inhibidores de citoquinas proinflamatorias como la *dexametasona*, han mostrado también buenos resultados en este sentido (Esposito et al., 2020; Matthay & Thompson, 2020).

A estos mecanismos humorales de inmunidad innata se suman la sobreexpresión de defensinas, la activación del sistema del complemento y la actividad fagocítica y citotóxica de diversos tipos celulares como monocitos/macrófagos, granulocitos, neutrófilos, células “*natural killers*” (NK) y células dendríticas (Weber, 2020). Los componentes humorales y celulares de la respuesta innata no solo tienen por objeto controlar la infección en las primeras etapas del ciclo, sino también inducir diversos mecanismos de la inmunidad adaptativa.

La respuesta pobre y tardía del IFN de tipo I en combinación con sobre-activación de la respuesta por citoquinas proinflamatorias se presenta como posible mecanismo involucrado en el síndrome hiperinflamatorio de pacientes con manifestaciones clínicas graves de COVID-19: insuficiencia respiratoria, insuficiencia renal, tromboembolias y otras complicaciones (Sokolowska et al., 2020).

### 3.1.1.2. RESPUESTA ADAPTATIVA

La respuesta adaptativa actúa de manera específica frente al virus y genera memoria, lo cual permite responder de forma mucho más rápida y eficaz frente a futuras infecciones y es el objetivo principal de las vacunas.

Las células dendríticas son las principales presentadoras de antígeno (APC, por *antigen-presenting cells*) y juegan un rol clave en la interconexión de las respuestas innata y adaptativa. Estas células migran desde las mucosas (donde fagocitan y procesan las proteínas virales) hacia los órganos linfoides, donde presentan diversos péptidos virales en complejo con las moléculas MHC de superficie. Esto conduce a la activación de linfocitos T y B vírgenes que reconocen dichos complejos a través de sus receptores de

superficie TCR (por *T cell receptor*) y BCR (por *B cell receptor*), respectivamente. Una vez que estas células se activan, proliferan y se diferencian, siendo las responsables de la generación de los brazos celular y humoral de la respuesta adaptativa.

### 3.1.1.2.1. RESPUESTA CELULAR

Las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes que poseen receptores TCR específicos contra péptidos virales presentados en complejo con moléculas MHC de clase I, se diferencian a células efectoras con actividad citotóxica (CTLs). Estas son capaces de migrar al sitio de infección y eliminar de manera específica aquellas células infectadas por el virus mediante secreción de proteínas citotóxicas, como por ejemplo granzimas (inductoras de apoptosis) y perforinas (generadoras de poros en la membrana de la célula infectada).

Por su parte, las células CD4<sup>+</sup> que reconocen péptidos virales en complejo con el MHC de clase II, se activan y polarizan al fenotipo de células T colaboradoras del tipo 1 (Th1) que secretan altos niveles de IFN $\gamma$ . Las Th1 participan en el desarrollo de la respuesta inmune que inhibe la replicación viral y colaboran en la diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> y de las células B. Por su parte, un tipo particular de células CD4<sup>+</sup>, las células T foliculares (Tfh), son necesarias para el cambio de isotipo a nivel de anticuerpos y para la selección de células B memoria y plasmocitos productores de anticuerpos de alta afinidad (Crotty, 2019).

La respuesta celular contra SARS-CoV-2 está caracterizada fundamentalmente por células Th1 con altos niveles de secreción de IFN $\gamma$ , específicas contra las proteínas estructurales S, M y N (en ese orden) y en menor medida proteínas no estructurales. La respuesta de células T CD8<sup>+</sup> contra SARS-CoV-2 también está caracterizada por la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , con una especificidad preferencial por la proteína S de superficie (Poland et al., 2020).

Tanto en pacientes infectados como recuperados de SARS-CoV-2, se detectan linfocitos maduros CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicos, sugiriendo que es posible desarrollar inmunidad protectora mediada por células. Además, en algunos individuos no infectados, se detectan linfocitos CD4<sup>+</sup> contra epítopes de la glicoproteína de superficie de SARS-CoV-2, lo cual podría tener implicancias en el tipo de respuesta y la severidad de una futura infección. También se ha observado que una activación potente de células T en pacientes con COVID-19 redundaba en una disminución del número de linfocitos (linfopenia), alteraciones en la diferenciación de éstos y pérdida de función, lo que podría estar asociado a una lenta eliminación del virus y extensión en el tiempo de la infección (Azkur et al., 2020; Hope & Bradley, 2021).

Cuando la infección por SARS-CoV-2 se resuelve, la mayoría de las células T efectoras son eliminadas, permaneciendo un grupo de células T memoria, que en el caso de infecciones con alto título viral mantienen su capacidad efectora (células memoria efectoras) mientras que en infecciones más leves y de

carga viral moderada se mantienen como células con capacidad de autorrenovación (células de memoria central) (Hope & Bradley, 2021). Por su parte, algunas células permanecen en el sitio de infección y se diferencian a células T memoria residentes ( $T_{RM}$ , por *tissue resident memory T cells*).

### 3.1.1.2.2. REPUESTA HUMORAL

Los linfocitos B vírgenes maduran en el bazo y migran a los distintos tejidos donde se encuentran con el antígeno. Aquellas células B que expresan en su superficie BCRs con afinidad por dichos antígenos, inician la captación de estos para luego ser presentados en complejos MHC II a células  $CD4^+$  (*T helper*) activadas contra dicho antígeno en los ganglios linfáticos, dando lugar a la etapa de proliferación (Yuseff et al., 2013).

Antes de abandonar los ganglios linfáticos, las células B continúan diferenciándose en los centros germinales, donde puede ocurrir maduración de afinidad por hipermutación somática de las regiones variables de los anticuerpos y selección positiva de los clones que retienen capacidad de unión al antígeno. Así, las células B que son seleccionadas continúan diferenciándose a células productoras de anticuerpos (plasmocitos) o a células B memoria con capacidad de responder rápidamente a nuevas infecciones.

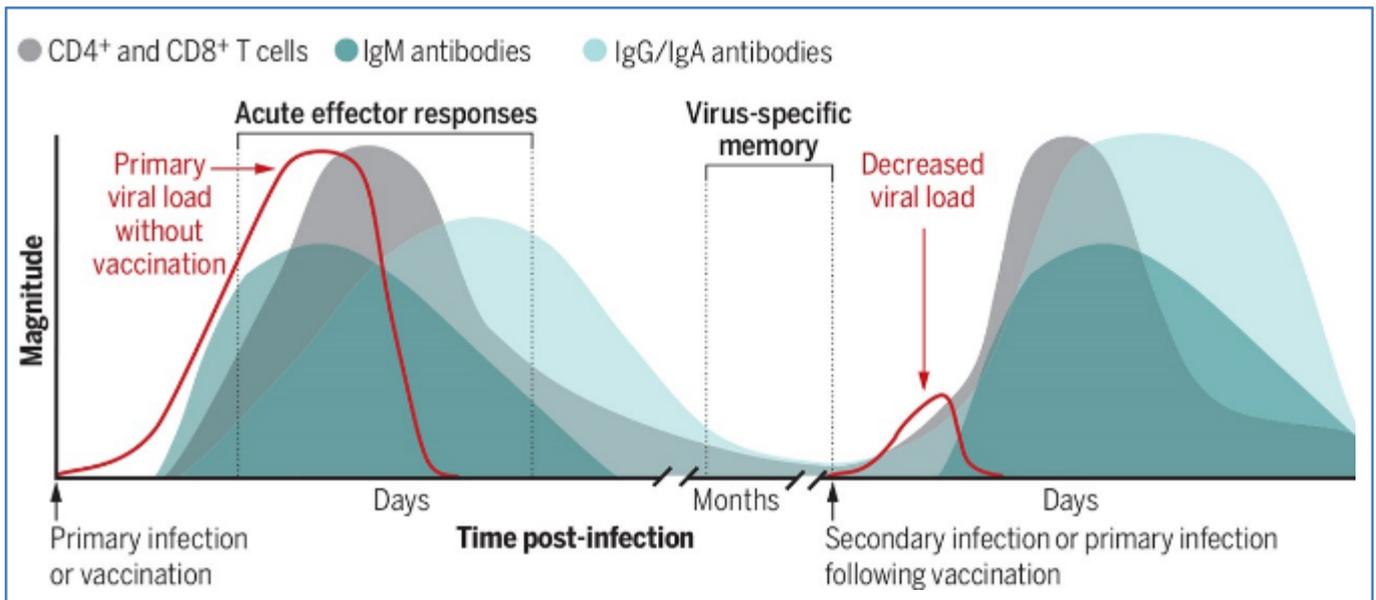
Además, las células B son sometidas a un proceso de cambio de clase (promovido por células T  $CD4^+$ ) en el que el dominio constante de la cadena pesada es sustituido, de modo que se producen anticuerpos con un mismo paratope pertenecientes a diferentes isotipos (IgM, IgA, IgG, IgD e IgE).

Diversos mecanismos efectores mediados por anticuerpos tienen que ver con la unión al antígeno y la interacción con componentes de la respuesta innata a través de sus dominios constantes Fc. El objetivo de estos mecanismos es eliminar directamente el virus o la célula infectada productora de nuevas partículas virales a través de la **activación del complemento por la vía clásica**, la **citotoxicidad celular mediada por anticuerpos** (ADCC por *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) y la **fagocitosis celular mediada por anticuerpos** (ADCP por *antibody-dependent cellular phagocytosis*). Se cree que en infecciones por SARS-CoV-2, la activación del complemento por la vía clásica permite eliminar células infectadas y se discute su implicancia en la evolución de casos severos (Java et al., 2020; Risitano et al., 2020). La ADCC permite reclutar células NK a través de receptores de Fc de inmunoglobulinas IgG1 e IgG3 (Fc $\gamma$ RIII) y eliminar la célula infectada mediante liberación de gránulos de granzima y perforina. Por su parte la ADCP utiliza un mecanismo similar para reclutar células fagocíticas como macrófagos y células dendríticas, eliminando partículas virales recubiertas de anticuerpos y realimentando el ciclo de presentación vía MHC para activar y diferenciar nuevas células T y B.

El otro mecanismo de acción de los anticuerpos depende exclusivamente de la interacción con el antígeno a través de las regiones variables y se conoce como **neutralización**. En el caso de las infecciones virales los

anticuerpos se unen a la superficie del virión impidiendo su entrada a la célula blanco y bloqueando la multiplicación viral en sus primeras etapas (**Figura 1.C**). En el SARS-CoV-2 la proteína S (responsable de la unión al receptor y de la fusión de las membranas) es también el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes (nAb). Dada la relevancia de este mecanismo en el marco de este trabajo de tesis, en el capítulo 4 (sección 4.1.1) profundizaremos sobre algunos aspectos de los anticuerpos neutralizantes con relación a SARS-CoV-2.

En casi la totalidad de los casos, la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 es indetectable durante los primeros 4-5 días post aparición de síntomas. Durante las siguientes tres semanas se observa un incremento de los niveles de IgM seguido de IgA e IgG. A continuación, los niveles de IgG continúan aumentando mientras que los de IgM comienzan a caer. Esta cinética lleva a que se produzca un incremento rápido de anticuerpos en los primeros días llegando a su valor máximo aproximadamente a los 20, días seguido de una caída paulatina y variable en función de la respuesta montada. En este período, el virus es normalmente eliminado y se generan células B y T memoria que responderán de manera más rápida en las siguientes infecciones por el mismo agente (Alejandro Lagunas-Rangel & Chávez-Valencia, 2021; Azkur et al., 2020; Hope & Bradley, 2021) (**Figura 17**). Luego de 6 meses, los niveles de IgG e IgM contra la glicoproteína S de SARS-CoV-2 caen significativamente, al igual que la actividad neutralizante del plasma; no obstante, los niveles de células B memoria se mantienen incambiados, mostrando una evolución continua de la respuesta humoral. Esta evolución en el largo plazo se asocia a la permanencia de estimulación por antígenos (usualmente a través de células dendríticas foliculares) y se refleja en un incremento en los niveles de hipermutación somática, aumento de la potencia de los anticuerpos producidos y mayor adaptabilidad de estos a la aparición de mutaciones en la proteína S (Gaebler et al., 2021; Hartley et al., 2020).



**Figura 17: Respuesta adaptativa frente a SARS-CoV-2.** Se presenta de manera esquemática la evolución de los componentes celulares y humorales de la respuesta adaptativa frente a infecciones o vacunas y el efecto de la generación de memoria inmunológica frente a infecciones futuras (Tomado de (Hope & Bradley, 2021))

La seroconversión puede ser detectada en la mayoría de los individuos infectados a los 20 días de la aparición de síntomas, siendo las proteínas S y N las más inmunogénicas y responsables de la seroconversión. Ambas proteínas presentan reactividad cruzada en SARS-CoV y SARS-CoV-2, siendo N la que presenta mayor homología (90.5%) mientras que S posee una homología de 76.4%, con niveles de conservación de hasta 50% a nivel de la superficie de interacción con el receptor celular (Alejandro Lagunas-Rangel & Chávez-Valencia, 2021).

### 3.1.1.3. INMUNIDAD Y PROTECCIÓN

Entender si es posible generar protección frente al SARS-CoV-2, cuán efectiva es esta respuesta y durante cuánto tiempo se mantiene, fueron interrogantes planteadas desde el inicio de la pandemia, que se reeditaron con las diferentes estrategias de vacunación y con la aparición de distintas variantes virales.

A nivel de infección, se encontró reactividad cruzada entre SARS-CoV-2 y otros coronavirus ya conocidos, demostrándose la capacidad de generar memoria tanto a nivel de células T (Grifoni et al., 2020; Le Bert et al., 2020) como de células B (Shrock et al., 2020), con implicancias directas sobre la severidad de la infección.

A pesar de la existencia de casos confirmados de reinfección por SARS-CoV-2, los estudios sistematizados con un número de individuos estadísticamente representativo demostraron que las reinfecciones ocurren con baja frecuencia aún en poblaciones con alto riesgo de exposición como trabajadores de la salud (Lumley et al., 2020; Wyllie et al., 2020). La aparición de nuevas variantes virales capaces de evadir la

respuesta inmune generada frente a infecciones previas puso de manifiesto la importancia de estudiar y controlar su circulación y transmisión (Prete et al., 2022).

En cuanto a la duración de la respuesta, se evaluaron los niveles de anticuerpos y células memoria (B, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>) circulantes en cerca de 200 individuos recuperados, demostrándose que luego de 6 meses el 95% de los individuos recuperados presentaba memoria inmunológica. Sin embargo, las cinéticas de los diversos componentes de la respuesta son diversas y heterogéneas (Dan et al., 2021).

Aún hoy no existe un correlato de protección (CoP) bien definido para infecciones graves por SARS-CoV-2, no obstante es claro que la capacidad de neutralización viral mediada por anticuerpos es uno de los indicadores más confiables tanto en individuos convalecientes (Khoury et al., 2021) como vacunados (Cromer et al., 2022; Earle et al., 2021)(Cromer et al., 2022; Earle et al., 2021). A estos debemos sumar las respuestas de tipo celular y otras funciones mediadas por anticuerpos (Tauzin et al., 2021; Yamin et al., 2021).

### 3.1.2. VACUNAS CONTRA SARS-CoV-2.

Las vacunas contra SARS-CoV-2 fueron desarrolladas con gran velocidad gracias al interés suscitado a nivel global, pero también a la reciente evolución de las tecnologías para desarrollar y producir vacunas eficaces. Además, la experiencia previa en coronavirus relacionados (como SARS-CoV y MERS-CoV) permitió identificar a la proteína S como blanco idóneo contra la cual dirigir la respuesta inmunológica (Amanat & Krammer, 2020).

Si bien en los últimos años ha existido un extenso número de desarrollos sometidos a pruebas clínicas, solo un puñado de vacunas se encontraban en fase clínica 4 a marzo de 2023: las vacunas a ARN (desarrolladas por Pfizer y Moderna), una vacuna a subunidades de Spike (desarrollada por Medigen + Dynavax + NIAID), las vacunas a virus inactivados (desarrolladas por Sinovac y Sinopharm) y las vacunas a vectores virales no replicativos (desarrolladas por AstraZeneca + Oxford University, CanSino Biological Inc. y Janssen Pharmaceutical) (World Health Organization, 2023).

Las **vacunas a ARN** son una estrategia novedosa de vacunación que venía desarrollándose previo a la pandemia (Pardi et al., 2018). Son baratas de desarrollar y adaptar, tienen alta potencia y son *a priori* más seguras que las vacunas a ADN. Sin embargo, no existían ejemplos con licenciamiento comercial previo a la pandemia, haciendo que la tecnología para su producción haya estado menos extendida. Además, la estabilidad del ARN es baja, requiriendo bajas temperaturas de almacenamiento y un vehículo apropiado para su ingreso en las células (Y. Dong et al., 2020). A pesar de estos inconvenientes, las vacunas de ARN para SARS-CoV-2 son las que han tenido mayor distribución, siendo las desarrolladas por *Pfizer/Biontech*

y *Moderna* las primeras en contar con autorización para su uso en emergencia (EUA) por la FDA (FDA News Release, 2020a, 2020b) y con autorización por parte de la EMA (EMA, 2021a, 2021c). Ambas formulaciones contienen material codificante para la proteína S de SARS-CoV-2. Ante la aparición de nuevas variantes capaces de evadir la respuesta, se han comenzado a implementar *boosters* bivalentes conteniendo ARNm de las variantes Wuhan y Omicron, con resultados que demuestran un aumento de la capacidad neutralizante contra la variante Omicron (Chalkias et al., 2022).

Las vacunas a **subunidades proteicas** presentan gran seguridad debido a la ausencia de ácidos nucleicos, sin embargo, al presentar un antígeno con complejidad reducida (muchas veces propia del sistema de expresión) pueden ver limitada su efectividad y en algunos casos generar una respuesta inmune desbalanceada (Y. Dong et al., 2020). Numerosos ensayos clínicos avanzados (fase 3) han sido llevados a cabo con este tipo de formulaciones, principalmente basadas en la proteína Spike o su dominio de unión al receptor (RBD). Un ejemplo de estas vacunas es la desarrollada por Novavax, basada en nanopartículas recubiertas con la proteína Spike (producidas en células infectadas con baculovirus), que es capaz de generar anticuerpos neutralizantes además de una potente respuesta a células T CD4<sup>+</sup> Th1 (Keech et al., 2020).

Las vacunas a virus inactivados o atenuados han sido utilizadas de manera histórica. Los **virus inactivados** son partículas producidas en grandes cantidades y sometidas a procesos físicos o químicos para prevenir la infección, que presentan diversas proteínas virales al sistema inmune con relativa estabilidad conformacional. Ejemplos de estas vacunas son las desarrolladas por *Sinovac* (China) (Y. Dong et al., 2020), aprobada para su uso en emergencia en nuestro país. Los **virus atenuados**, son similares pero tienen como principal desventaja su potencial capacidad para revertir y volverse virulentos, y por tal motivo son menos utilizados.

Las vacunas a **vectores virales** consisten en un virus “*carrier*” (usualmente adenovirus o poxvirus) que llevan una proteína del virus de interés y tienen como principal ventaja la presentación del antígeno en el contexto de una infección viral real, estimulando la respuesta inmune innata requerida para activar la respuesta adaptativa. Ejemplos de este tipo de vacunas dirigidas contra SARS-CoV-2 son las desarrolladas por el Gamaleya Research Institute (Rusia) utilizando una combinación de adenovirus Ad5 y Ad26 y por la Universidad de Oxford/AstraZeneca (UK) utilizando un adenovirus de chimpancé. Ambas utilizan la proteína S y fueron rápidamente sometidas a ensayos de fase clínica III con revisión por pares (Logunov et al., 2021; Voysey et al., 2021), al tiempo que la de Oxford/AstraZeneca contó además con autorización de uso en Europa por parte de la EMA (EMA, 2021b). El uso de adenovirus humanos presenta la desventaja de utilizar un vector que puede haber infectado previamente al receptor de la vacuna, resultando en la

generación de una respuesta desbalanceada. Por su parte, las vacunas contra SARS-CoV-2 basadas en adenovirus de chimpancé han mostrado casos raros de trombocitopenia trombótica con consecuencias graves para los individuos que la padecen (Greinacher et al., 2021; Schultz et al., 2021), haciendo que su uso haya sido seguido de cerca y destinado a poblaciones con menor probabilidad de presentar este tipo de reacciones adversas.

Como hemos visto hasta aquí, la amplia mayoría las vacunas desarrolladas contra SARS-CoV-2 utilizan la proteína S como inmunógeno. Teniendo en cuenta que la capacidad neutralizante de los anticuerpos juega un rol clave en el control de las infecciones virales y tiene consecuencias en el diseño de vacunas (Lv et al., 2020), es fundamental medir la respuesta frente a estas, no solo en términos de título de anticuerpos, sino también por su capacidad para generar actividad neutralizante.

### 3.1.2.1. LA VACUNACIÓN EN URUGUAY

La aplicación de vacunas eficaces contra SARS-CoV-2 ha demostrado ser una estrategia exitosa para reducir la transmisión viral y la severidad de la enfermedad. Dos de las vacunas más utilizadas a nivel mundial han sido CoronaVac basada en SARS-CoV-2 inactivado (Sinovac Life Sciences, Beijing, China) y BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) basada en ARNm.

En marzo de 2020 se diagnosticaron los primeros casos de COVID-19 en Uruguay. Al inicio de 2023, de una población total de 3.5 millones de habitantes, se habían reportado más de 1 millón de casos confirmados de infección por SARS-CoV-2, y más de 7600 personas habían fallecido (Edouard Mathieu et al., 2020). En febrero de 2021, el Ministerio de Salud Pública de Uruguay autorizó el uso de emergencia de las vacunas CoronaVac (Y. Zhang et al., 2021) (600 SU de virus inactivado por dosis) y BNT162b2 (Polack et al., 2020) (30 µg por dosis) en dos dosis administradas con 28 días de diferencia. Siete meses después (septiembre de 2021) las autoridades de Salud Pública autorizaron la administración de una dosis de refuerzo con BNT162b2 para el subconjunto de la población completamente vacunado con CoronaVac. En ese momento, aproximadamente el 68% de la población había completado el esquema de vacunación primario con alguna de estas plataformas implementadas (el 62.7% de los vacunados había recibido CoronaVac y el 35.5% había recibido BNT162b2, mientras que el restante 1.8% fue inmunizado con la vacuna de AstraZeneca proporcionada por la iniciativa COVAX) (Edouard Mathieu et al., 2020).

Tanto CoronaVac como BNT162b2 han demostrado gran eficacia para prevenir hospitalizaciones dos semanas después de la administración de la segunda dosis (2D) (Jara et al., 2021; Tenforde et al., 2022), simultáneamente con la detección de altos niveles de anticuerpos específicos en suero contra la proteína Spike del SARS-CoV-2 (Sadarangani et al., 2021). Aunque los parámetros inmunológicos necesarios para definir un correlato de protección posterior a la vacunación (CoP) contra la infección por SARS-CoV-2 aún

están en discusión, la neutralización viral mediada por anticuerpos se ha considerado uno de los contribuyentes más importantes (Cromer et al., 2022), junto con otras funciones mediadas por anticuerpos como las respuestas efectoras mediadas por Fc (Tauzin et al., 2021). Algunos estudios encontraron que las vacunas inactivadas de SARS-CoV-2 generan niveles más bajos de anticuerpos neutralizantes respecto de las plataformas vacunales a ARNm (Wilder-Smith & Mulholland, 2021) y la disminución en el tiempo de los niveles de anticuerpos específicos ha sido reportada tanto para BNT162b2 (Kertes et al., 2022; Levin et al., 2021))(Kertes et al., 2022; Levin et al., 2021) como para CoronaVac (Cucunawangsih et al., 2021).

Ante esta realidad, la aplicación de dosis de refuerzo se convirtió en una alternativa estratégica que debió coexistir con la alta demanda y una distribución global equitativa de vacunas. Uruguay fue uno de los primeros países en proporcionar dosis de refuerzo en aquellos sectores de la población que había recibido vacunas a virus inactivados. Si bien hoy en día el porcentaje de la población uruguaya que recibió al menos una dosis de refuerzo es cercano al 60% de la población, al momento de llevar a cabo este trabajo existía escasa información sobre el uso de un refuerzo con BNT162b2 en individuos completamente vacunados con 2 dosis de CoronaVac (S. M. S. Cheng et al., 2022; Pérez-Then et al., 2022). Por tales motivos era necesario entender la cinética de la respuesta humoral frente en individuos sanos frente a la administración de dichas dosis de refuerzo.

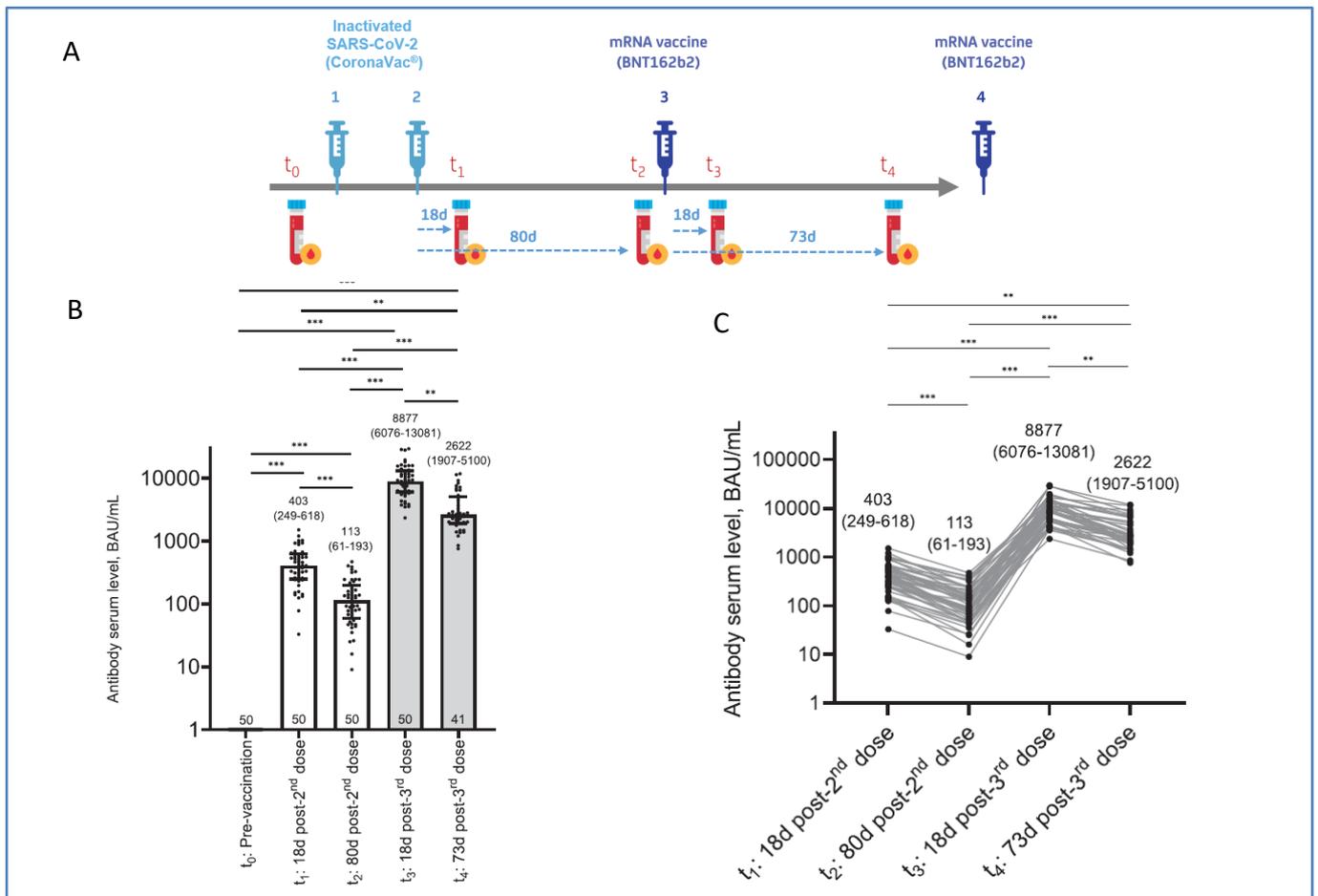
### **3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2**

Analizar la respuesta humoral frente a la administración de dosis de vacunación de tipo heterólogas mediante el uso de ensayos serológicos basados en la proteína RBD producida en células S2 de *Drosophila*.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. LA TERCERA DOSIS HETERÓLOGA RECUPERA LOS NIVELES DE IgG ESPECÍFICAS CONTRA SARS-COV-2

Para conocer la dinámica de los anticuerpos IgG séricos contra SARS-Cov-2 durante la aplicación de un programa de vacunación heteróloga en población general, realizamos un estudio prospectivo longitudinal en individuos sanos. Para ello utilizamos test serológicos cuantitativos fabricados con la proteína RBD<sup>clv</sup> producida en células S2 de *Drosophila* (tal como se describió en el capítulo anterior). Así, cuantificamos los niveles de IgG específicas en participantes sanos que recibieron un plan de dos dosis de CoronaVac seguido de la administración de una tercera dosis (3D) heteróloga de BNT162b2 (**Figura 18.A**). Los resultados se expresan en unidades de unión de anticuerpos por mililitro de suero (BAU/mL).



**Figura 18: Evolución de los niveles séricos de IgG anti RBD de SARS-CoV-2 a lo largo del estudio. A)** Esquema del transcurso temporal de las inmunizaciones con vacunas a virus atenuados y de ARNm con las correspondientes tomas de muestra y los tiempos transcurridos desde la última dosis recibida (flechas discontinuas). **B)** Niveles séricos de IgG anti-RBD en diferentes momentos del seguimiento de la cohorte expresados como gráficos de dispersión. Las barras y los números sobre ellas representan los valores medios de cada punto temporal (con los correspondientes rangos intercuartílicos entre paréntesis). El número de individuos evaluados en cada punto temporal se muestra en la base de cada barra. Las barras correspondientes a las muestras de suero obtenidas después de la tercera dosis se presentan en gris. **C)** Representación de los niveles séricos de IgG anti-RBD mostrando la evolución individual de cada participante a lo largo del estudio. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Friedman y la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. \*\*p = 0,01-0,001, \*\*\*p < 0,001. BAU, unidades de unión de anticuerpos.

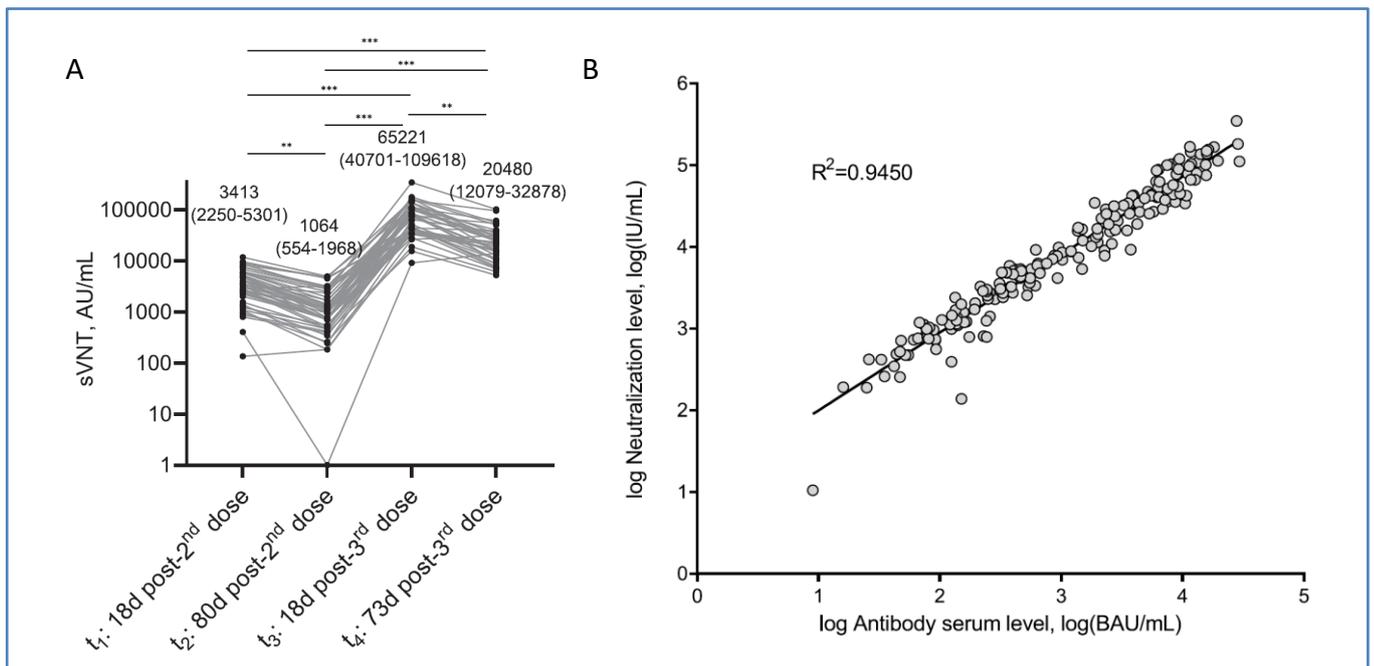
El análisis de las muestras de suero de los participantes previo al inicio de la vacunación ( $t_0$ ) mostró ausencia de anticuerpos IgG anti-RBD específicos (individuos seronegativos), mientras que la totalidad de participantes mostraron seroconversión a los 18 días de recibir la segunda dosis de CoronaVac ( $t_1$ ) con una mediana de 403 BAU/mL con un rango intercuartílico entre 249 y 618 (IQR 249-618, por “*interquartile range*”) (**Figura 18.B**). A los 80 días de recibir la segunda dosis ( $t_2$ ), los 50 individuos analizados permanecieron seropositivos, aunque con una disminución importante en el nivel de anticuerpos IgG anti-RBD (mediana de 113 BAU/mL, IQR 61-193) (**Figura 18.B**). Esto es consistente con estudios previos que demostraron una disminución del nivel de anticuerpos específicos en el tiempo, tanto para BNT162b2 (Kertes et al., 2022; Levin et al., 2021) como para las vacunas de CoronaVac (Cucunawangsih et al., 2021). Es interesante destacar que la administración de una tercera dosis con BNT162b2 evidenció un aumento significativo de los anticuerpos IgG anti-RBD en suero después de los 18 días ( $t_3$ ), alcanzando una mediana de 8877 BAU/mL (IQR 6076-13081) (**Figura 18.B**). Finalmente, después de aproximadamente 2,5 meses (mediana de 73 días) de recibir la tercera dosis ( $t_4$ ), el nivel de anticuerpos IgG anti-RBD específicos en 41 individuos de nuestra cohorte disminuyó nuevamente, pero alcanzando un valor promedio de 2622 BAU/mL (IQR 1907-5100) (**Figura 18.B**). Aunque la magnitud de la respuesta a la tercera dosis fue similar a la reportada en la literatura para dosis de refuerzo con BNT162b2 (Thomas et al., 2021), se necesitan estudios adicionales para evaluar la duración de la respuesta y su impacto en la protección a largo plazo contra la infección por SARS-CoV-2. A pesar de las diferencias individuales, todos los participantes mostraron la misma tendencia en términos de niveles de IgG específicas (**Figura 18.C**).

### **3.3.2. LA TERCERA DOSIS HETERÓLOGA IMPLICA TAMBIÉN UN AUMENTO DE LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE Y DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS**

Si bien los test serológicos utilizados en este trabajo se basan en el dominio de unión al receptor, resulta interesante entender como evoluciona la capacidad de neutralización viral frente a los diferentes *boosters* vacunales. Nuestro país no cuenta con instalaciones provistas con los niveles de bioseguridad necesarios para llevar a cabo ensayos de neutralización viral por reducción de placas (PRNT); además, el número de muestras era relativamente alto si se quería hacer un seguimiento longitudinal que involucrara todas las etapas pautadas (alrededor de 200 muestras de suero).

Por tales motivos, decidimos aplicar ensayos alternativos de neutralización viral (sVNT), los cuales mostraron que la tendencia vista en los niveles de IgGs era acompañada por una evolución similar en la capacidad de bloqueo de la interacción RBD-ACE2 en los participantes que recibieron un esquema de

vacunación heterólogo con CoronaVac + BNT162b2. El seguimiento de la capacidad de bloqueo de la interacción RBD-ACE2 mostró una caída entre  $t_1$  y  $t_2$  [mediana de 3413 AU/mL (IQR 2250-5301) vs. 1064 AU/mL (IQR 554-1968), respectivamente], una mejora significativa inmediatamente después de la tercera dosis con BNT162b2 ( $t_3$ ) y finalmente, una reducción entre  $t_3$  y  $t_4$  [mediana de 65221 AU/mL (IQR 40701-109618) vs. 20480 AU/mL (IQR 12079-32878), respectivamente] (**Figura 19.A**). Según las especificaciones del kit sVNT utilizado para esto, el título de neutralización se puede interpretar como bajo (<1500AU/mL), medio (1500-5000AU/mL) y alto (>5000). Además, estas capacidades de bloqueo se correlacionan linealmente con los niveles de IgG anti-RBD en cada punto temporal (**Figura 19.B**).

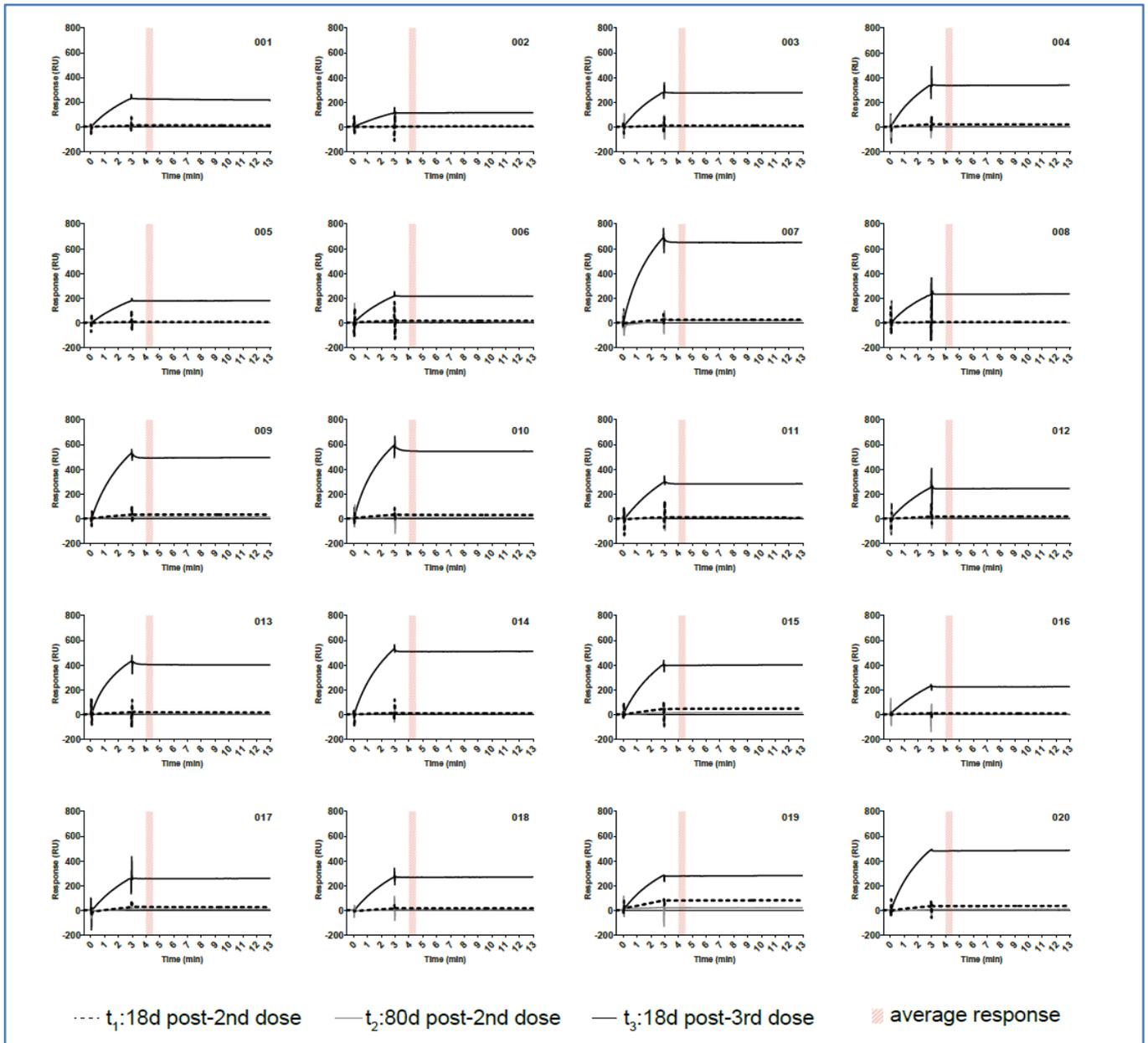


**Figura 19: Evolución de la actividad neutralizante analizada con sVNT comerciales a lo largo del estudio. A)** Representación de los niveles de neutralización mostrando la evolución individual de cada participante a lo largo del estudio. **B)** Correlación entre la capacidad de neutralización y los niveles séricos de IgG anti-RBD. La figura muestra la correlación entre los niveles de neutralización obtenidos utilizando un kit sVNT para detección de Anticuerpos Neutralizantes del SARS-CoV-2 (cPass™, GenScript®) y los niveles séricos de IgG anti-RBD utilizando el Kit ELISA COVID-19 IgG QUANT (desarrollado por la Universidad de la República, el Instituto Pasteur de Montevideo y ATGen, SRL). Esta correlación se realizó sobre 191 muestras de suero de individuos vacunados. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Friedman y la prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn. \*\*p = 0,01-0,001, \*\*\*p < 0,001. BAU, unidades de unión de anticuerpos.

Más allá de la cantidad, la calidad de la respuesta de anticuerpos producidos después de la vacunación es fundamental para proteger contra la infección por SARS-CoV-2. En este sentido, la eficacia neutralizante es el correlato de protección más estudiado (Cromer et al., 2022). En línea con los resultados previos, encontramos una correlación significativa entre los niveles de IgG anti-RBD específicos en suero y la capacidad de bloqueo de la interacción RBD-ACE2. Además, utilizando un kit comercial de sVNT, pudimos demostrar que los anticuerpos producidos después de la vacunación heteróloga son funcionales y pueden neutralizar el virus de manera efectiva. La eficacia neutralizante de los anticuerpos específicos fue comparable a la observada después de una vacunación primaria con dos dosis de BNT162b2 (Dinc et al.,

2022; Tenforde et al., 2022) y similar a los niveles observados después de una infección natural (Lim et al., 2021).

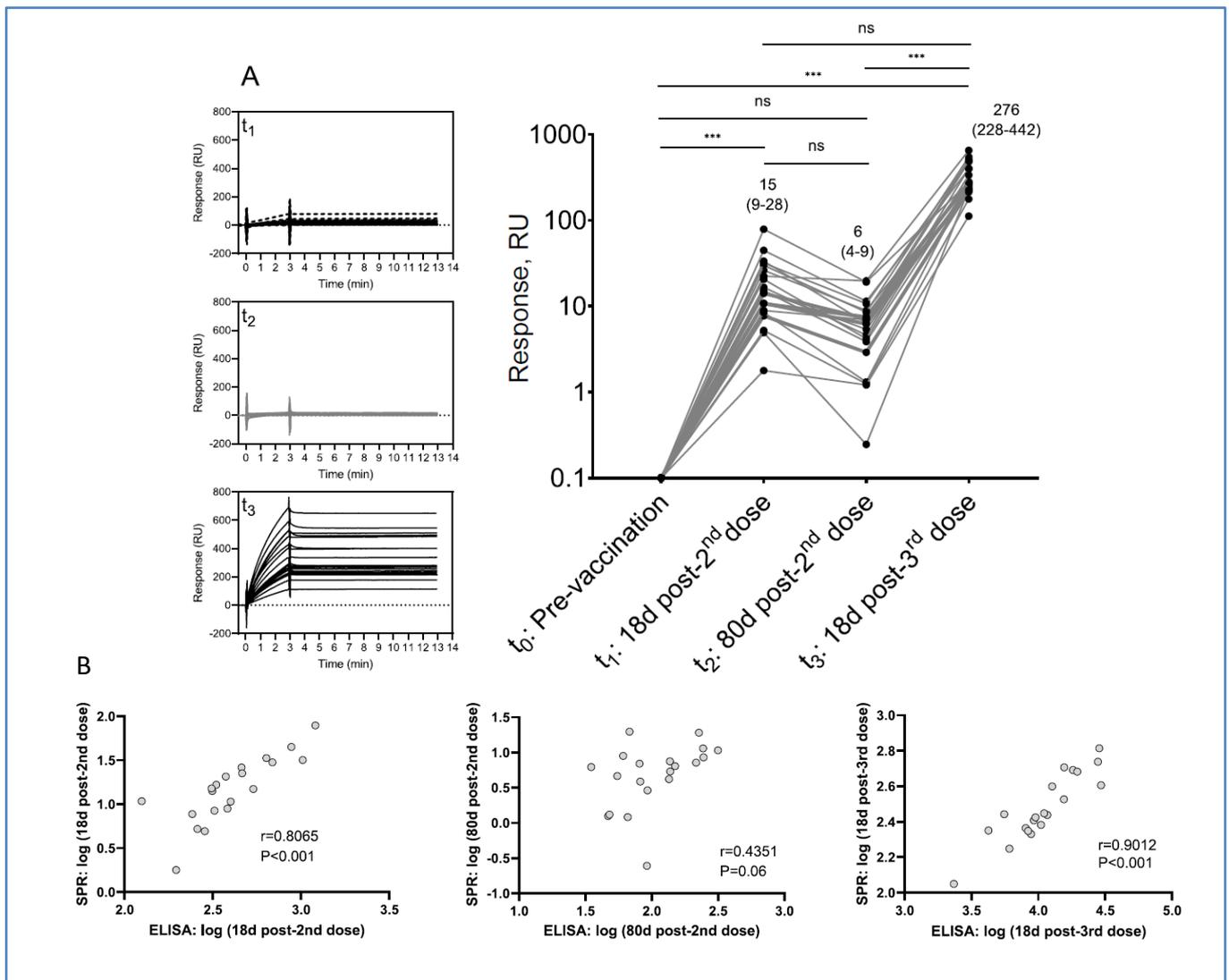
La técnica de SPR permite detectar la interacción de moléculas en tiempo real y cuantificar de manera precisa su cinética de asociación cuando se trabaja con muestras puras. Si bien esto representa una gran limitación para estudiar muestras séricas cuya composición de anticuerpos específicos es heterogénea y su concentración molar es difícil de cuantificar, la comparación de las cinéticas de disociación analizadas por SPR ha sido presentada como una alternativa para evaluar la respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 (Schasfoort et al., 2021). Con el propósito de evidenciar la maduración de la respuesta humoral con las sucesivas inmunizaciones, comparamos la interacción de los anticuerpos séricos totales por SPR, utilizando sueros de 20 individuos seleccionados de forma arbitraria, tras recibir un esquema de vacunación heteróloga. Todos los individuos inmunizados mostraron valores superiores a los obtenidos con muestras de suero pre-vacunación ( $t_0$ ) y la señal alcanzada después de la tercera dosis fue claramente superior (**Figura 20**). Sin embargo, como consecuencia de la afinidad y la avidéz, la disociación de los anticuerpos específicos resultó extremadamente lenta, provocando que el nivel de anticuerpos unidos permaneciera casi incambiado durante más de 10 minutos después de terminar la inyección. Esto impidió comparar las cinéticas de disociación y encontrar vinculaciones con la maduración de la respuesta. Igualmente, registramos el nivel de anticuerpos unidos (en unidades arbitrarias de SPR, RUs) después de 1 minuto de disociación, como una medida indirecta del nivel de anticuerpos específicos totales.



**Figura 20: Análisis por SPR de las cinéticas de unión de los anticuerpos específicos totales.** Los sensorgramas se obtuvieron con muestras de suero de 20 individuos inmunizados con un esquema de vacunación heterólogo, los cuales fueron inyectados sobre el antígeno <sup>Wuhan</sup>RBD-ST inmovilizado en la superficie del sensorchip. Cada panel corresponde a un solo individuo, y las muestras de suero de diferentes etapas de inmunización se identifican con los colores de las curvas (las líneas negras segmentadas y grises continuas corresponden a sueros obtenidos 18 y 80 días después de la segunda dosis con CoronaVac, respectivamente; las líneas negras continuas corresponden a sueros obtenidos 18 días después de la tercera dosis con BNT162b2). Todos los sensorgramas se normalizaron restando con los datos obtenidos de su correspondiente suero preinmune. Las líneas verticales delimitan el periodo arbitrario durante el cual, se promedió la señal para cuantificar sistemáticamente el nivel de anticuerpos unidos totales, en unidades de resonancia (RU).

Así, los valores obtenidos en  $t_2$  exhibieron una disminución con respecto a  $t_1$ , evidenciando una disminución temporal en el nivel de anticuerpos específicos circulantes totales. Los resultados obtenidos 18 días después de la tercera dosis con BNT162b2 ( $t_3$ ) resultaron en un aumento pronunciado en el nivel de anticuerpos específicos totales (**Figura 21.A**). Nuevamente, este comportamiento está en concordancia con los resultados obtenidos por ELISA (**Figura 18.C**), mostrando una fuerte correlación positiva entre los

niveles de IgG específicas y los niveles de anticuerpos específicos totales, medidos por SPR poco después de la administración de las dosis vacunales (**Figura 21.B**).

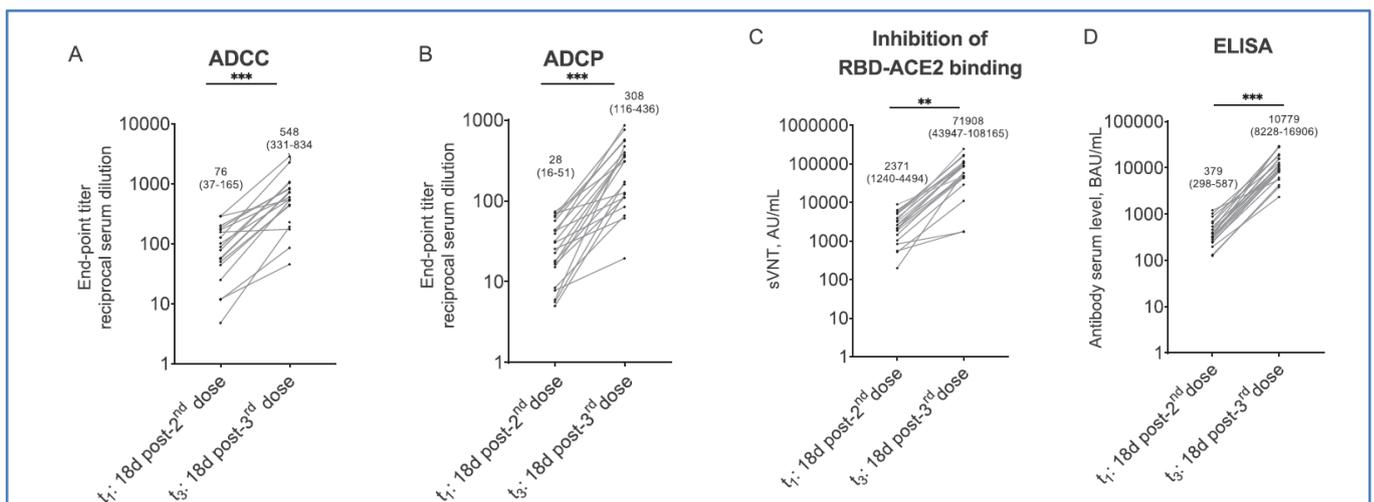


**Figura 21: Evolución de los niveles de anticuerpos totales anti-RBD medidos por SPR. A)** Los recuadros de la izquierda muestran las cinéticas de unión (sensorgramas) de muestras de suero de 20 individuos seleccionados de la cohorte y recogidas en diferentes momentos (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Los niveles de anticuerpos específicos totales medidos por SPR tras 1 min de disociación se presentan a diferentes tiempos con líneas grises que muestran la evolución individual en el tiempo. **B)** Diagramas de correlación entre los niveles de anticuerpos medidos por SPR y ELISA a partir de muestras de suero de 20 individuos recogidas 18 días después de la segunda dosis (*izquierda*), 80 días después de la segunda dosis (*medio*) y 18 días después de la tercera dosis (*derecha*). Los resultados obtenidos con muestras recogidas 18 días después de la segunda y tercera dosis mostraron una correlación muy fuerte entre ambas técnicas. En el caso de muestras con bajo nivel de anticuerpos específicos, como las obtenidas 80 días después de la segunda dosis, la correlación es significativamente más débil, probablemente debido a la baja sensibilidad de la técnica de SPR. Los niveles de anticuerpos específicos totales se calcularon como se describe en el material suplementario. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) y los valores P (two tailed) (P) se presentan en la esquina inferior derecha de cada gráfico.

### 3.3.3. LA TECERA DOSIS HETERÓLOGA IMPLICA TAMBIÉN AUMENTO DE LAS RESPUESTAS EFECTORAS MEDIADAS POR ANTICUERPOS

El reconocimiento específico y la capacidad de neutralizar el virus son características importantes de la respuesta inmune por anticuerpos. Adicionalmente, las funciones efectoras mediadas por Fc (como ADCC y ADCP) se relacionan con la protección contra múltiples patógenos (L. L. Lu et al., 2018), incluida la

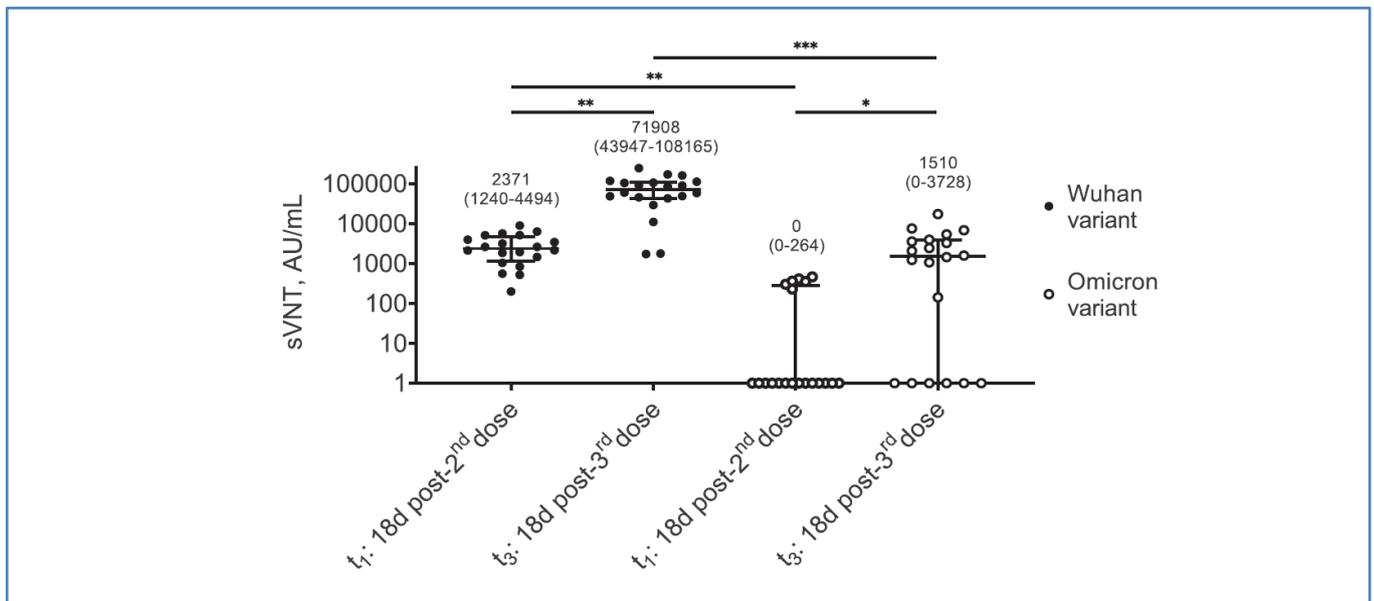
respuesta humoral generada por la vacunación contra el SARS-CoV-2 en modelos animales (Gorman et al., 2021) y en humanos (Prieto et al., 2022). Para avanzar en nuestro conocimiento sobre este aspecto, realizamos ensayos reporteros de ADCC y ADCP *in vitro* en muestras de suero de 20 participantes recogidas 18 días después de la segunda dosis con CoronaVac ( $t_1$ ) y 18 días después de la tercera dosis con BNT162b2 ( $t_3$ ). Así, encontramos que el refuerzo con BNT162b2 aumentó el nivel de ADCC desde una mediana de 76 (IQR 37-165) a 548 (IQR 331-834), y el de ADCP de una mediana de 28 (IQR 16-51) a 308 (IQR 116-436), en línea con el comportamiento descrito en las secciones anteriores de este capítulo (**Figura 22.A-D**). En nuestro estudio, encontramos que una única dosis de refuerzo con BNT162b2 aumentó significativamente la capacidad de los anticuerpos para mediar la lisis de células infectadas y la fagocitosis de partículas virales. Estos resultados son consistentes con estudios previos que muestran un aumento en las funciones efectoras mediadas por Fc después de una dosis de refuerzo con BNT162b2 (Krause et al., 2021). Sin embargo, se necesita más investigación para determinar el papel exacto de estas funciones efectoras en la protección contra la infección por SARS-CoV-2.



**Figura 22: Funciones mediadas por Fc e inhibición de la unión RBD-ACE2 de inmunoglobulinas séricas anti-RBD específicas.** Se presenta la evolución individual de 20 participantes, poco después de recibir la segunda dosis de Coronavac ( $t_1$ ) y tras recibir el refuerzo heterólogo con BNT162b2 ( $t_3$ ) para las funciones de las inmunoglobulinas séricas anti-RBD basadas en ADCC mediadas por Fc (A), ADCP mediadas por Fc (B), y Neutralización (C) junto con los niveles séricos de IgG anti-RBD (D). Los títulos finales de ADCC y ADCP se calcularon interpolando a la línea de base el recíproco de las diluciones séricas, cuyos valores se determinaron para cada placa como la señal media en ausencia de suero más tres desvíos estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba de Wilcoxon. \* $p < 0,05$ , \*\* $p = 0,01-0,001$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Las nuevas variantes de SARS-CoV-2 han mostrado gran capacidad de adaptación, con una disminución de la neutralización por anticuerpos inducidos con las vacunas (Mok et al., 2022; Seija, Rammauro, Santiago, et al., 2022). Al momento de publicar estos resultados, la variante Omicron era globalmente dominante y había sido identificada como responsable de una nueva ola de contagios en nuestro país. Por tal motivo, decidimos comparar la capacidad de bloqueo de los anticuerpos desarrollados frente a la vacunación, contra las variantes de SARS-CoV-2 de Wuhan y Omicron mediante ensayos sVNT con estos mismos 20 sueros (**Figura 23**). Nuestro análisis muestra una clara reducción de la actividad contra la variante de

Omicron en ambos momentos, post-2D [mediana de variante de Wuhan, 2371 AU/mL (IQR 1240-4494) vs. mediana de variante de Omicron, 0 AU/mL (IQR 0-264)] y post-3D [mediana de variante de Wuhan, 71908 AU/mL (IQR 43947-108165) vs. mediana de variante de Omicron, 1510 AU/mL (IQR 0-3728)]. A pesar de esto, no encontramos ninguna correlación entre el título de bloqueo del SARS-CoV-2 de la variante Wuhan y Omicron en ninguno de los puntos temporales analizados.



**Figura 23: Evolución de la respuesta neutralizante frente a la variante Omicron.** Comparación de la inhibición de la unión RBD-ACE2 contra las variantes Wuhan y Omicron del SARS-CoV-2 analizada mediante sVNT en 20 individuos a t<sub>1</sub> y t<sub>3</sub>. Los números representan la mediana y el intervalo intercuartílico se muestra entre paréntesis. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba de Wilcoxon. \*p < 0,05, \*\*p = 0,01-0,001, \*\*\*p < 0,001.

Como veremos con más detalle en el capítulo siguiente, la aparición de variantes de preocupación, como la variante Delta y Omicron, ha generado preocupaciones sobre la efectividad de los anticuerpos inducidos por la vacunación. En nuestro estudio encontramos una disminución en la actividad neutralizante contra la variante Omicron respecto a la variante de Wuhan. Sin embargo, estos resultados son preliminares, requiriéndose más investigación para comprender completamente el impacto de estas variantes en la efectividad de las vacunas.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que una dosis de refuerzo con BNT162b2 después de una vacunación primaria con CoronaVac, induce una respuesta humoral robusta y multifacética que puede contribuir a la protección contra la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para evaluar la duración de la respuesta y su impacto en la protección a largo plazo contra la infección por SARS-CoV-2. Además, es necesario profundizar las investigaciones para determinar el papel exacto de las funciones efectoras mediadas por Fc en la protección contra la infección por SARS-CoV-2.

A la hora de interpretar nuestros hallazgos es importante tener en cuenta algunas de sus limitaciones. La primera es el tamaño de la muestra; ya que si bien hicimos un seguimiento de los niveles de IgG a lo largo

de cinco puntos, cubriendo pre y post vacunación, la cantidad de individuos es reducida. La segunda limitación se refiere a la falta de un grupo de refuerzo con CoronaVac, debido a que el Ministerio de Salud Pública de Uruguay no utilizó CoronaVac como opción de refuerzo. Por esta razón, prácticamente no hay personas con una tercera dosis de CoronaVac en nuestro país. En tercer lugar, Uruguay carecía de acceso local a instalaciones de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) para realizar pruebas de reducción de placas por neutralización (PRNT), que es la técnica “*gold standard*” para detectar y cuantificar anticuerpos neutralizantes (NAbs). Por esta razón, realizamos una prueba de neutralización sustituta que claramente tiene limitaciones, como la ausencia de membranas biológicas y otras proteínas o dominios proteicos con un papel relevante en los procesos de unión y fusión viral. Finalmente, las respuestas de células T inducidas durante la vacunación representan un aspecto relevante de la respuesta a vacunas, la cual no evaluamos.

### 3.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este capítulo proporcionamos nuevas evidencias sobre la vacunación heteróloga de refuerzo con CoronaVac y BNT162b2 en individuos sanos, mostrando la dinámica de los niveles de anticuerpos específicos después de aproximadamente 2,5 meses.

Se encontró una correlación significativa entre los niveles de anticuerpos anti-RBD, su capacidad de bloqueo de la interacción RBD-ACE2 y sus actividades efectoras (ADCC o ADCP), lo que respalda que las pruebas serológicas económicas y de fácil implementación son herramientas importantes para monitorear la respuesta inmune después de la vacunación y definir las dosis de refuerzo.

Además, dado que las vacunas basadas en plataformas de ARN mensajero han demostrado con el tiempo ser seguras y efectivas, el uso de una vacunación de refuerzo heteróloga con CoronaVac y BNT162b2 representa una estrategia prometedora y segura.

Las vacunas basadas en virus inactivados fueron en su momento herramientas útiles en la lucha global contra la COVID-19, aunque se necesitan más datos sobre su eficacia contra las variantes emergentes del SARS-CoV-2 y sobre la durabilidad de la protección en diferentes grupos de edad, entornos geográficos y en presencia de comorbilidades.

Contar con capacidades para estudiar la respuesta humoral frente a nuevas variantes emergentes es fundamental para ayudar a entender las necesidades de refuerzos vacunales y aportar información confiable para la toma de decisiones sobre la administración de nuevas dosis, tanto en población general como en ciertas poblaciones particulares.

## 3.5. METODOLOGÍA

### 3.5.1. DATOS DE LA COHORTE Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Cincuenta individuos, el 60% mujeres, con una edad mediana de 40 años (IQR 30–50) pertenecientes al personal del Instituto Pasteur de Montevideo y se sometieron a una vacunación voluntaria heteróloga con CoronaVac y BNT162b2, fueron inscritos en un estudio de seguimiento serológico post-vacunación. Se recolectaron muestras de suero en cinco momentos: antes de la vacunación ( $t_0$ ); después de un seguimiento medio de 18 días (IQR 16–23) post-2D ( $t_1$ ); 80 días (IQR 78–82) post-2D ( $t_2$ ); 18 días (IQR 16–20) post-3D con BNT162b2 ( $t_3$ ); y finalmente, 73 días (IQR 72–81) post-3D (para 41 de 50 participantes) ( $t_4$ ). Todos los participantes declararon no haber sido diagnosticados con COVID-19 antes o durante el desarrollo del estudio, en dos cuestionarios realizados en  $t_0$  y en  $t_3$ . Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y fue aprobado por la junta ética institucional (MSP 956,220 – CEI 001-2021). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes.

### 3.5.2. ELISA CUANTITATIVO

Los niveles séricos de IgG anti-RBD (variante de Wuhan) se cuantificaron utilizando el Kit de ELISA COVID-19 IgG QUANT (desarrollado por la Universidad de la República, Instituto Pasteur de Montevideo y ATGen SRL), según las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron en BAU/mL (por “binding antibody units”), utilizando un estándar internacional para la calibración del ensayo (Primer Estándar Internacional de la OMS para inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 (código del NIBSC: 20/136) (<https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>).

### 3.5.3. ENSAYO ALTERNATIVO DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL (sVNT)

El bloqueo de la interacción entre RBD-ACE2 por anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2 se analizó utilizando un ensayo alternativo de neutralización viral *in vitro* (sVNT; cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit, GenScript\_). Para este estudio se utilizaron muestras de suero de individuos que recibieron vacunación heteróloga en  $t_1$  y  $t_2$  (post-2D con CoronaVac) y en  $t_3$  y  $t_4$  (post-3D con BNT162b2). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el RBD recombinante conjugado con HRP se preincubó con diferentes diluciones de muestras de suero humano y luego se agregó a microplacas ELISA recubiertas con ACE2, con el objetivo de analizar la capacidad de los anticuerpos séricos específicos para inhibir la interacción RBD-ACE2. Se utilizó un suero calibrador (Cat. No. A02087, GenScript\_) de 1.000.000 unidades arbitrarias por mililitro (AU/mL) según las instrucciones del fabricante, lo que permitió generar una curva estándar diluyendo en serie el suero calibrador de 600

AU/mL a 9.37AU/mL. Para interpolar un valor de título semicuantitativo en AU/mL se utilizaron las densidades ópticas de las diluciones de suero medidas a 450 nm que se encontraban en el rango lineal de la curva estándar. Los valores obtenidos se corrigieron con el factor de dilución correspondiente, dando lugar al valor final en AU/mL para cada muestra de suero.

### **3.5.4. RESONANCIA PLASMONICA DE SUPERFICIE (SPR)**

Para evaluar la unión de anticuerpos específicos totales contra RBD se realizaron ensayos de SPR con muestras de suero obtenidas en cuatro momentos diferentes ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ) de un subgrupo de 20 individuos que recibieron vacunación heteróloga CoronaVac/BNT162b2, utilizando el RBD-ST expresado en células S2 de *Drosophila* de acuerdo con la sección 2.3.1 del capítulo 2.

Los ensayos de SPR se realizaron en un Biacore 3000 a 25°C y 10µL/min utilizando HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20) como buffer de corrida y un sensorchip CM5 (Cytiva) previamente recubierto con StrepTactin de Twin-Strep-tag® Capture Kit (IBA) según las recomendaciones del fabricante. Para la captura se realizó una inyección de un minuto de 10nM RBD-STII para capturar 140 RU de proteína. En paralelo, se utilizó una superficie no derivatizada (sin RBD-STII) como referencia. El antígeno se eliminó con tres inyecciones consecutivas de 10µL de GuHCl 3M y se recapturó en cada ciclo, dando lugar a resultados altamente reproducibles. Las muestras de suero se diluyeron 1:50 en buffer de corrida y se inyectaron sobre ambas superficies durante 3 minutos (con respuestas que dependen de la afinidad global y la concentración de anticuerpos específicos totales) seguidos de una fase de disociación de 10 minutos en la que se permitió que los anticuerpos se lavaran mediante flujo continuo de buffer. Los datos se referenciaron de manera doble, restando las señales de la superficie de referencia y los datos de la muestra de suero del individuo correspondiente obtenido antes de la vacunación, utilizando el software BIAevaluation versión 4.1. Después de 1 minuto de disociación, la señal (expresada en unidades de resonancia, RUs) se promedió a lo largo de un periodo de 30 segundos para cuantificar el nivel de anticuerpos específicos totales unidos contra el RBD del SARS-CoV-2 en cada muestra.

### **3.5.5. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y FAGOCITOSIS CELULAR DEPENDIENTES DE ANTICUERPOS (ADCC Y ADCP)**

ADCC y ADCP se realizaron en las mismas 20 muestras de suero en  $t_1$  y  $t_3$ , utilizando ensayos de informadores ADCC y ADCP (InvivoGen) según las instrucciones del fabricante con diferencias menores.

Brevemente, se recubrieron microplacas de ELISA Nunc con 200 ng de RBD<sup>clv</sup> recombinante (expresado en células de insecto como se ha descrito anteriormente) y se bloquearon con una solución de BSA al 4% (w/v). Las muestras de suero, diluidas inicialmente 1:5 y seguidas de diluciones seriadas al doble, se

incubaron en la placa durante 1 h a 37 °C. Se añadieron células efectoras (células Jurkat-Lucia™ NFAT modificadas para expresar el alotipo humano FcγRIIIA V158 -ensayo reportero ADCC-, o el alotipo humano FcγRIIA H131 -ensayo reportero ADCP-) en cada pocillo a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/pocillo (100 μl). A continuación, las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de cultivos celulares durante seis horas. Finalmente, se transfirieron 20 μl/pocillo de sobrenadante de cultivo celular a placas planas blancas de 96 pocillos (Thermo), se añadió el reactivo QUANTI-Luc™ (InvivoGen) y las placas se leyeron inmediatamente utilizando el luminómetro de microplacas LUMIstar OPTIMA (BMG LABTECH). Los valores relativos de las unidades de luminiscencia (RLU) que representan los resultados del bioensayo reportero se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.2.0.332. Los RLUs se calcularon interpolando el recíproco de las diluciones de suero a la línea de base, cuyos valores se determinaron para cada placa como la señal media en ausencia de suero, luego de sumarle tres desviaciones estándar.

### 3.5.6. ANALISIS DE DATOS

El análisis de los datos contó con la desinteresada colaboración del Dr. Hugo Naya de la Unidad de Bioinformática del Instituto Pasteur de Montevideo. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el test de Friedman y el test de comparación *post-hoc* múltiple de Dunn o test de Wilcoxon. Aunque las pruebas no paramétricas utilizadas en comparaciones múltiples generalmente arrojaron diferencias significativas en todos los contrastes utilizados, en algunos casos, las comparaciones *post-hoc* fueron significativas en forma marginal, principalmente debido al bajo número de observaciones. Para superar esta dificultad, utilizamos modelos lineales mixtos (paquetes R “lme4” y “emmeans”) con corrección de Tukey sobre el logaritmo de las concentraciones, modelando al individuo como un efecto aleatorio. Previo a esto, verificamos las suposiciones de normalidad y homoscedasticidad a través de la prueba de Shapiro-Wilks y la prueba de Breusch-Pagan estandarizada, respectivamente. En todos los casos, las comparaciones *post hoc* fueron altamente significativas ( $p\text{-valor} < 1 \times 10^{-6}$ ). Los resultados de los bioensayos se obtuvieron en unidades de luminiscencia relativa (RLUs) y se expresaron como títulos de punto final. Para evaluar la consistencia en el nivel de anticuerpos específicos medidos por ELISA y SPR, calculamos coeficientes de correlación de Pearson (“two-tailed”) con un intervalo de confianza del 95%.

# CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE ENSAYOS ALTERNATIVOS DE NEUTRALIZACIÓN PARA VARIANTES DE PREOCUPACIÓN DE SARS-CoV-2

## 4.1. INTRODUCCIÓN

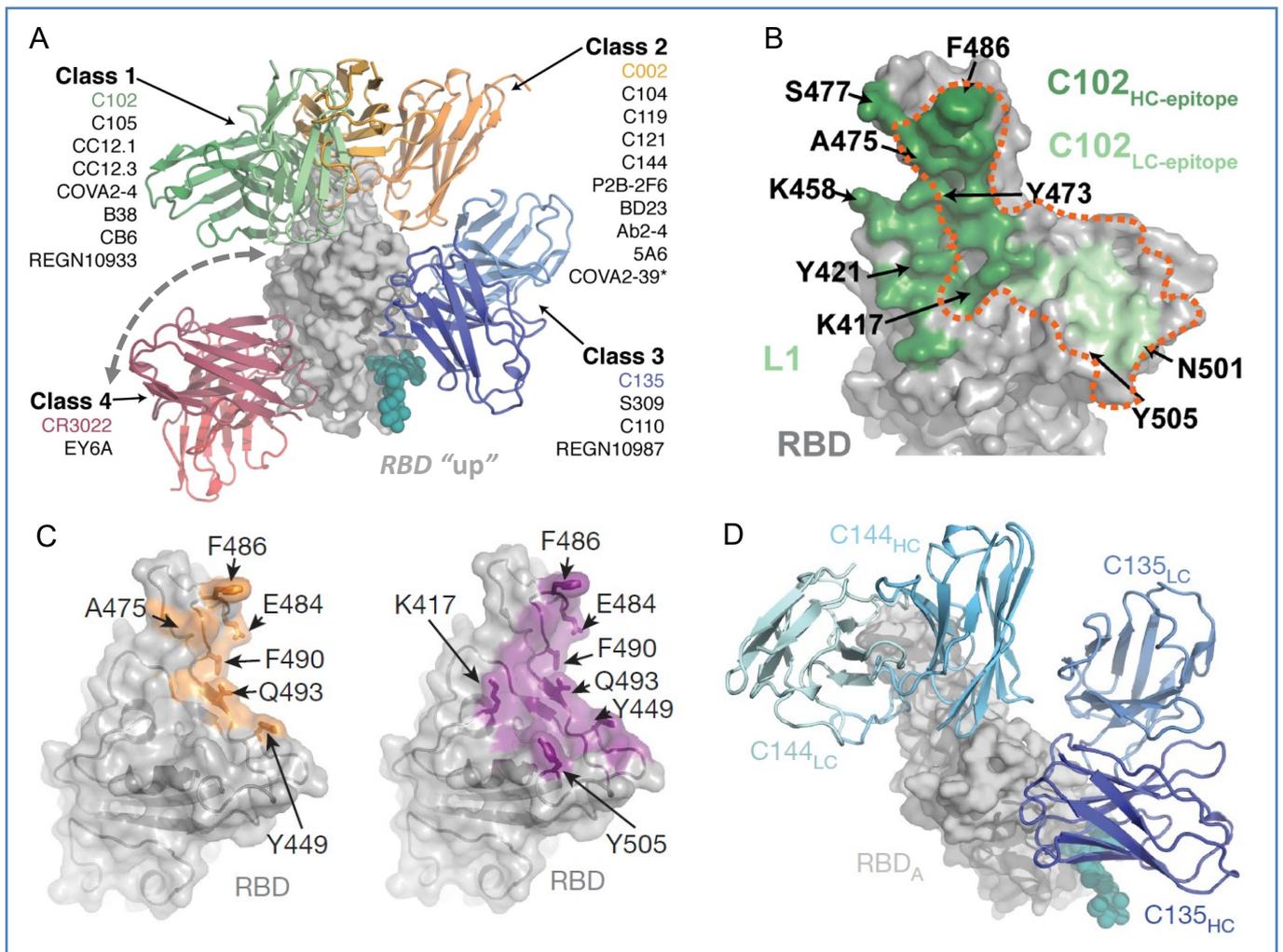
### 4.1.1. ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Los anticuerpos neutralizantes son la única opción para adquirir inmunidad esterilizante para evitar la entrada del virus en la célula, lo cual es clave para evitar infecciones y reinfecciones.

El bloqueo de la entrada del virus mediante neutralización por anticuerpos puede ocurrir por diversos mecanismos como son la interacción directa con el sitio de unión al receptor celular (RBM para el SARS-CoV-2), la estabilización o bloqueo de estados conformacionales de la proteína S que restringen la accesibilidad de dicho sitio al receptor celular, la hiper-estabilización del estado pre-fusión para impedir la fusión y la desestabilización prematura para dar lugar a un estado post-fusión en el momento y lugar equivocados.

Los anticuerpos neutralizantes que reconocen el RBD son mayoritarios y existen múltiples formas de clasificarlos. La **Figura 24** presenta de forma gráfica una de estas clasificaciones que los divide en 4 clases de acuerdo al epítipo y la conformación requerida para que puedan acceder a estos: clase 1, capaces de unirse a la superficie de contacto con ACE2 (RBM) solo cuando el RBD se encuentra en la conformación “up”; clase 2, capaces de unirse a RBD en ambas conformaciones “up” y “down”, siendo además capaces de unirse en forma simultánea a dos RBD de protómeros adyacentes; clase 3, con capacidad de unirse a RBD a través de epítipos ubicados fuera del RBM; y clase 4, capaces de unirse una región de RBD fuera del RBM pero solo accesible en el estado “up” (región que interactúa con el *loop* entre HC y HR1) (Barnes et al., 2020). El principal mecanismo de neutralización de estos anticuerpos se basa en impedir la interacción del RBD con ACE2, con excepción de los de clase 4 cuya unión a RBD se cree que facilita el desensamblaje prematuro de la proteína Spike y la desestabilización del estado pre-fusión (D. Zhou et al., 2020).

También se han reportado anticuerpos neutralizantes con capacidad de unirse a *spike* a través de epítopes ubicados en otros dominios fuera del RBD. Ejemplos de esto son los anticuerpos con alta capacidad de neutralización que unen el dominio NTD de la subunidad S1 (Brouwer et al., 2020; L. Liu et al., 2020; McCallum et al., 2021). El mecanismo por el cual estos anticuerpos logran impedir la entrada del virus no está del todo claro, y aunque podría basarse en una simple obstaculización estérica para impedir que RBM acceda a ACE2, otras hipótesis plantean que actúan interfiriendo con los cambios conformacionales desencadenados tras la unión del receptor que son claves para la fusión y entrada del virus (Cerutti et al., 2021).



**Figura 24: Epitopes de anticuerpos neutralizantes contra el RBD de SARS-CoV-2. A)** Representación de la superficie del RBD con una orientación aproximadamente "up" (gris) formando complejos con la región variable de diferentes anticuerpos neutralizantes pertenecientes a 4 clases diferentes (representados en "cartoon"). La flecha gris discontinua representa una aproximación de la trayectoria del movimiento "pivot" del RBD cuando pasa a la conformación "down". Bajo cada clase se presenta una lista de anticuerpos que las integran. **B)** Superficie del sitio de unión al receptor del RBD con los epitopes de las cadenas pesadas y livianas (verde) del anticuerpo C102 perteneciente a la clase 1. **C)** representación de la superficie de dos RBDs (gris) con los epitopes de los anticuerpos C002 y C121 perteneciente a la clase 2 coloreados en amarillo y violeta, respectivamente. **D)** Representación de un RBD (gris) unidos a los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas (HC y LC) de dos anticuerpos C144 y C135 pertenecientes a las clases 2 y 3 respectivamente. Tomado de (Barnes et al., 2020).

Los anticuerpos neutralizantes son producidos como parte de la respuesta adaptativa frente a la infección por SARS-CoV-2 y frente a las vacunas con capacidad de generar anticuerpos contra spike. Sin embargo, la acción neutralizante de los anticuerpos es también buscada en las intervenciones terapéuticas basadas en la administración de anticuerpos monoclonales como el cocktail casirivimab/imdevimab (REGN109333/REGN10987 en la **Figura 24.A**) autorizado por la FDA para su uso en emergencia. La administración de plasma convaleciente (también autorizada por la FDA en emergencia) cuenta con la recomendación de utilizar muestras de plasma que cumplan con todos los criterios de aceptación y que cuenten con título alto. Además, dicho organismo recomienda que en aquellos casos que sea posible, se determine la actividad neutralizante de los mismos y se incluya este criterio en la selección.

#### **4.1.2. ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL Y ALTERNATIVAS**

La metodología “*gold standard*” para detectar y cuantificar anticuerpos neutralizantes frente a SARS-CoV-2, se basa en la utilización de aislamientos de virus con capacidad infectiva mediante ensayos de reducción de placas (PRNT, por “*plaque reduction neutralization test*”). En estos ensayos, las partículas virales son mezcladas con una dilución de anticuerpos (provenientes de suero, plasma o formulaciones de anticuerpos monoclonales) y luego aplicada sobre una monocapa confluyente de células susceptibles y permisivas a la infección, la cual es cuantificada mediante el conteo de placas de lisis. La reducción del número de placas como consecuencia de la acción neutralizante puede medirse en función de las diluciones de anticuerpos, haciendo posible su titulación. Esta técnica requiere varios días de crecimiento celular, y en el caso de SARS-CoV-2, su implementación debe llevarse a cabo en un laboratorio con nivel 3 de bioseguridad (BSL3) y personal capacitado, lo cual dificulta su aplicación en forma masiva (Galipeau et al., 2020).

Una alternativa con el objetivo de caracterizar múltiples muestras en forma *high-throughput* es la utilización de una variante reportera de SARS-CoV-2 (en la que el ORF 7a es sustituido por el gen de una proteína fluorescente) y la eficiencia de infección (en presencia de anticuerpos) se detecta determinando el porcentaje de células infectadas (fluorescentes) (Muruato et al., 2020). Otros trabajos con líneas celulares reporteras utilizan la fluorescencia por formación de sincitios como alternativa para analizar la neutralización de variantes de SARS-CoV-2 (Planas, Bruel, et al., 2021). Estos métodos tienen la ventaja de ser implementados de forma más masiva en placas de cultivo de 96 pocillos, no obstante el carácter patogénico del virus reportero requiere que sean igualmente efectuados en condiciones BSL3.

La utilización de pseudovirus basadas principalmente en partículas de VIH o VSV (virus de la estomatitis vesicular) con la proteína Spike trimérica expresada en su superficie (Crawford et al., 2020; Nie et al., 2020)

son una alternativa muy usada. Los ensayos de neutralización con pseudovirus son llevados a cabo bajo normas de bioseguridad de nivel 2 (BSL2) y presentan una alta correlación respecto a los ensayos con partículas de SARS-CoV-2 (Schmidt et al., 2020). Sin embargo, este tipo de ensayos también requiere tiempo de crecimiento celular y su implementación masiva ofrece limitaciones.

En este sentido, los test alternativos de neutralización viral o sVNT (*surrogate virus neutralization test*), son ensayos que utilizan proteínas del virus y su receptor celular (usualmente dominios de Spike y hACE2) para evidenciar la capacidad de los anticuerpos neutralizantes de competir con dicha interacción, sin necesidad de llevar a cabo experimentos de cultivo celular (Tan et al., 2020; Walker et al., 2020). Durante la emergencia sanitaria por SARS-CoV-2, dos sVNT en formato ELISA de competición contaron con autorización de uso por parte de la FDA y fueron comercializados por las compañías Genscript e InBios de EEUU (U.S. Food & Drug Administration, 2022). El primero de ellos, fue el resultado de un trabajo pionero para detectar de manera sencilla anticuerpos neutralizantes con especificidad por SARS-CoV-2 (Tan et al., 2020) y ha sido ampliamente utilizado por la comunidad científica durante la pandemia (nuestros resultados del capítulo 3 son un ejemplo de esto). Este tipo de ensayos se limitan a evaluar la actividad neutralizante por unión al RBD, no obstante, tienen como ventaja la capacidad de ser aplicados de forma rápida, masiva, con mínimos requerimientos de equipamiento y medidas de bioseguridad.

El sVNT de Genscript ha sido sometido a múltiples estudios de comparación con ensayos PRNT y pseudovirus, demostrando una excelente correlación (Meyer et al., 2020; Murray et al., 2021; Oguntuyo et al., 2021; Valcourt et al., 2021), y ha sido utilizado para correlacionar la actividad neutralizante con los niveles de anticuerpos determinados por ensayos serológicos de diversos fabricantes (Ismail et al., 2021; Jung et al., 2021; Kim et al., 2021; Kitagawa et al., 2022; Younes et al., 2021).

La lista de ensayos con similares características resulta inabarcable, con numerosos ejemplos de sVNT en formato tipo ELISA donde una de las proteínas de la interfase virus-célula se inmoviliza al soporte sólido, mientras la otra es conjugada a una enzima (usualmente HRP) e incubada junto a los anticuerpos neutralizantes. Desde el punto de vista de su diseño, tanto ACE2 como los dominios de Spike han sido inmovilizados al soporte sólido, observándose diferentes resultados aunque con una performance aceptable respecto a los ensayos PRNT (Kohmer et al., 2021; Münsterkötter et al., 2022; Pieri et al., 2022).

Además, los ensayos sVNT tipo ELISA también son utilizados para la detección de pequeños compuestos inhibidores de la interacción Spike-ACE2. Un ejemplo es el kit COVID-19 Spike-ACE2 Binding Assay Kit comercializado por Raybiotech Life Inc., con una patente activa en EE.UU. (US 11105804 B1), que ha sido utilizado en investigación dirigida al descubrimiento y reposicionamiento de pequeñas moléculas y

compuestos naturales con capacidad de inhibir la interacción virus-célula (Boroduske et al., 2021; Olaleye et al., 2020, 2021).

Por último, es interesante destacar que la detección de anticuerpos neutralizantes con este tipo de ensayos no se lleva a cabo a través del dominio Fc, y por ende su uso no está limitado a un isotipo particular, ni posee exclusividad de especie (como ocurre con los test serológicos para detectar y cuantificar anticuerpos específicos). Esta característica los posiciona como una alternativa válida para la detección de anticuerpos neutralizantes en diversas especies (Embregts et al., 2021; Perera et al., 2021), cobrando relevancia dado el origen zoonótico del SARS-CoV-2 y los numerosos reportes de circulación del virus en diversos animales domésticos y salvajes.

### **4.1.3. NUEVAS VARIANTES EMERGENTES**

El genoma a ARN y la alta tasa de circulación han llevado a que surjan y se adapten numerosas variantes de SARS-CoV-2, planteándose la necesidad de lidiar con la presencia del virus (al menos en forma de olas temporales o estacionales (Scudellari, 2020)), donde la aparición de nuevas variantes que puedan escapar a la acción de los anticuerpos neutralizantes o desafiar la batería de medidas disponibles para hacer frente a la infección, podría ocurrir con relativa frecuencia (Andreano et al., 2020; Baum et al., 2020; Q. Li et al., 2020; Z. Liu et al., 2020; Piccoli et al., 2020; Starr, Greaney, Addetia, et al., 2020).

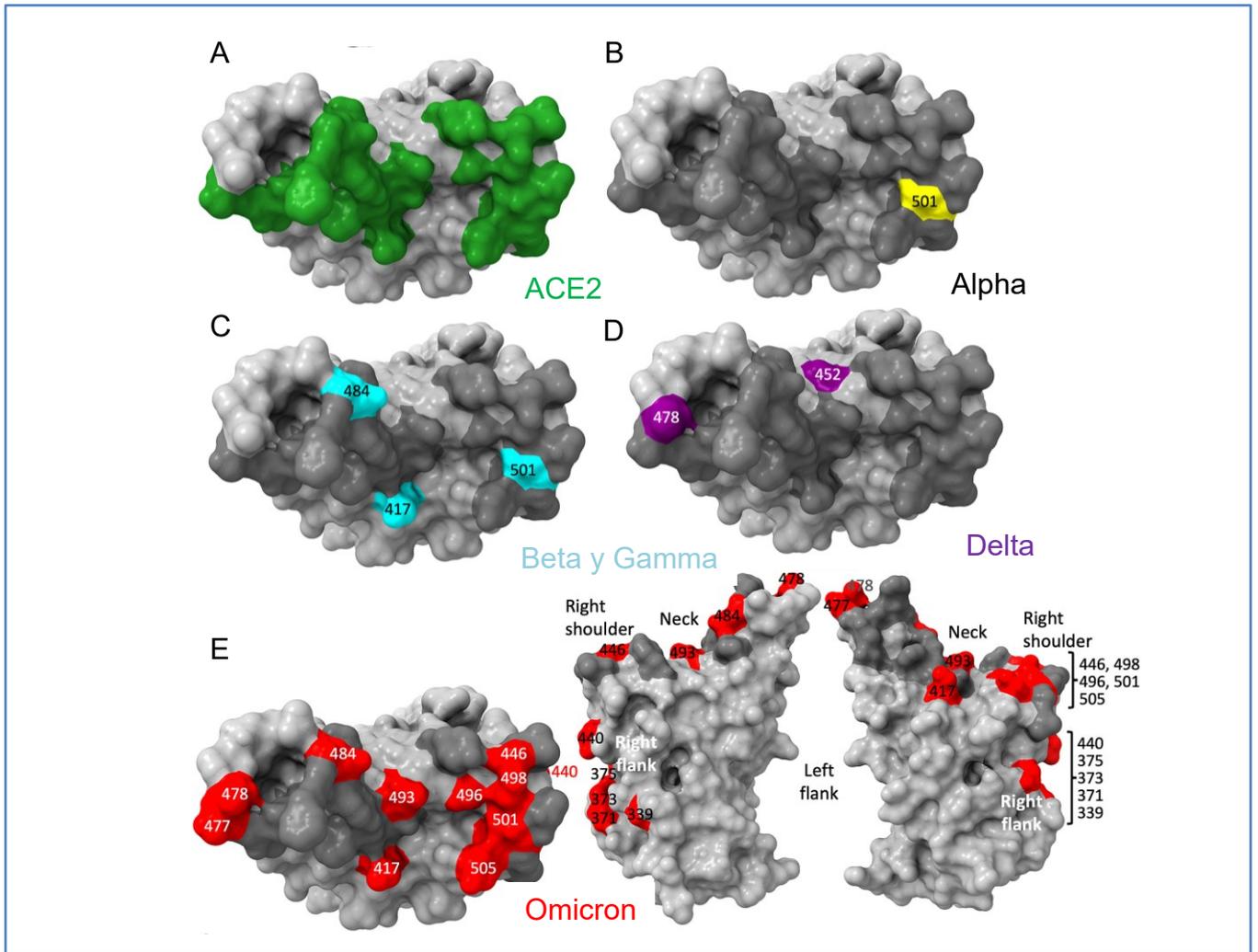
La sustitución D614G en la subunidad S2 de Spike fue identificada en marzo de 2020 y rápidamente se estableció como una nueva variante prevalente, diseminándose a nivel global (Korber et al., 2020). Esta modificación potencia la infectividad del virus, aumentando la funcionalidad de S en la superficie de las partículas virales sin afectar la afinidad de unión al receptor ni la actividad neutralizante (L. Zhang et al., 2020), y se ha visto que en modelos animales potencia su replicación en el tracto respiratorio superior, favoreciendo su transmisión (Plante et al., 2021). Esto llevó a que dicha modificación se estableciera rápidamente siendo conservada en las numerosas variantes emergentes, que mediante la incorporación de diversas mutaciones, vieron potenciada su transmisibilidad y capacidad de evadir la respuesta inmune. Estas nuevas variantes virales fueron formalmente catalogadas por la OMS como “*variantes de preocupación*” (VOCs, por “*variants of concern*”).

Muchas de las mutaciones presentes en las VOCs tienen lugar a nivel de Spike y algunas incluso a nivel de RBD, favoreciendo la interacción con el receptor (y por ende su capacidad infectiva) y/o la evasión de la respuesta inmune. Entre las VOCs más relevantes se destacan: una variante identificada en Reino Unido en setiembre de 2020 (linaje B.1.1.7 identificada como variante *Alpha*)(Davies et al., 2021); una variante identificada en octubre de 2020 en Sudáfrica, surgida de manera independiente a la anterior pero

compartiendo ciertas características comunes (linaje B.1.351 identificada como variante *Beta*) (Tegally et al., 2021); una variante identificada en Brasil (linaje P.1 identificada como variante *Gamma*) (Faria et al., 2021) con varias sustituciones y deleciones, que podrían estar relacionadas con una mayor transmisión y tasas de re-infección (CDC, 2020); una variante originada en India a mediados de 2021 que causó un brote catastrófico en este país y llegó a desplazar a la variante *Alpha* en Inglaterra (linaje 1.617.2 identificada como *Delta*) (Challen et al., 2021); y por último, la variante *Omicron* (linaje B.1.1.529) que al igual que las sub-variantes sucesoras, presenta un gran número de modificaciones fundamentalmente a nivel de RBD, que favorecen su transmisibilidad y le confieren gran capacidad para evadir tanto la respuesta por anticuerpos neutralizantes generados frente a las demás VOCs, como a múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales y vacunas (Cao et al., 2022; Dejnirattisai et al., 2022).

La **Figura 25** resume las sustituciones características de las VOCs a nivel del RBD, las cuales en su mayoría se ubican sobre el RBM y tienen implicancias sobre la afinidad de unión al receptor (H. Liu, Wei, Kappler, et al., 2022; Ramanathan et al., 2021). A modo de resumen tenemos que:

- a. La asparagina 501 de la variante ancestral (Wuhan), ubicada en la región distal del trímero de Spike (muy cerca del eje de trimerización cuando el RBD se encuentran en posición “*down*”), se encuentra sustituida por un residuo tirosina en todas las VOCs, a excepción de la variante *Delta*.
- b. La variante ancestral posee una lisina en la posición 417, ocupando una ubicación central en el RBM. Este residuo es sustituido por una asparagina (en las variantes *Beta* y *Omicron*) o por una treonina (en la variante *Gamma*).
- c. El ácido aspártico en la posición 484 de la variante ancestral conforma un *loop* estabilizado por puentes disulfuro que extiende la superficie del RBM hacia el extremo N-terminal del receptor ACE2. Este residuo ha sido sustituido por una lisina (en las variantes *Beta* y *Gamma*) o por un residuo de alanina (en *Omicron*).
- d. La variante *Delta* se diferencia del resto presentando dos sustituciones a nivel de residuos cercanos al RBM que no forman parte de la superficie de interacción con ACE2 en la variante ancestral: la leucina en la posición 452 y la treonina en la posición 478. Las sustituciones de la variante *Delta* por residuos con carga positiva (L452R, T478K) permiten establecer nuevos contactos moleculares con el receptor ACE2, aumentando la superficie de interacción del RBM.
- e. La variante *Omicron* posee numerosas sustituciones adicionales en el RBM, cuya sumatoria de efectos redundante fundamentalmente en una gran capacidad de evadir la neutralización viral sin que su unión al receptor sea reducida.



**Figura 25: Sustituciones en el RBM de múltiples VOCs de SARS-CoV-2.** A) Superficie del RBD de SARS-CoV-2 identificada en gris claro, con aquellos residuos que contactan con ACE2 (RBM) marcados en verde. En el resto de los paneles, el RBM se indica en gris oscuro con las sustituciones características identificada en colores. **B-D)** Superficie del RBM de las variantes Alpha, Beta, Gamma y Delta con las sustituciones características representados en amarillo, cian y violeta. **E)** Superficie del RBM de la variante Omicron con las sustituciones características representados en rojo (*izquierda*) y vistas laterales del RBD de Omicron con todas las sustituciones identificadas en rojo. *Adaptado de* (Dejnirattisai et al., 2022).

El efecto protector de las vacunas, los anticuerpos monoclonales neutralizantes y el plasma de pacientes recuperados de infecciones por las primeras variantes, se ha visto notablemente afectado frente a estas nuevas variantes. Por tal motivo, las estrategias de intervención basadas en la acción de anticuerpos neutralizantes han sido revisadas sistemáticamente frente a la aparición de nuevas variantes (Kupferschmidt, 2021; P. Wang et al., 2021; Z. Wang et al., 2021).

Por todo esto, contar con capacidad para dimensionar el efecto de la aparición de nuevas variantes frente a la transmisibilidad del virus y su comportamiento frente a la acción neutralizante de los anticuerpos, resulta de enorme utilidad para adelantarse a la llegada y establecimiento de nuevas variantes. En este sentido, la implementación de estudios reduccionistas llevados a cabo *in vitro* con las proteínas implicadas en los procesos de entrada y neutralización del virus, son una alternativa relativamente rápida y segura para llevar a cabo el control y la vigilancia del SARS-CoV-2.

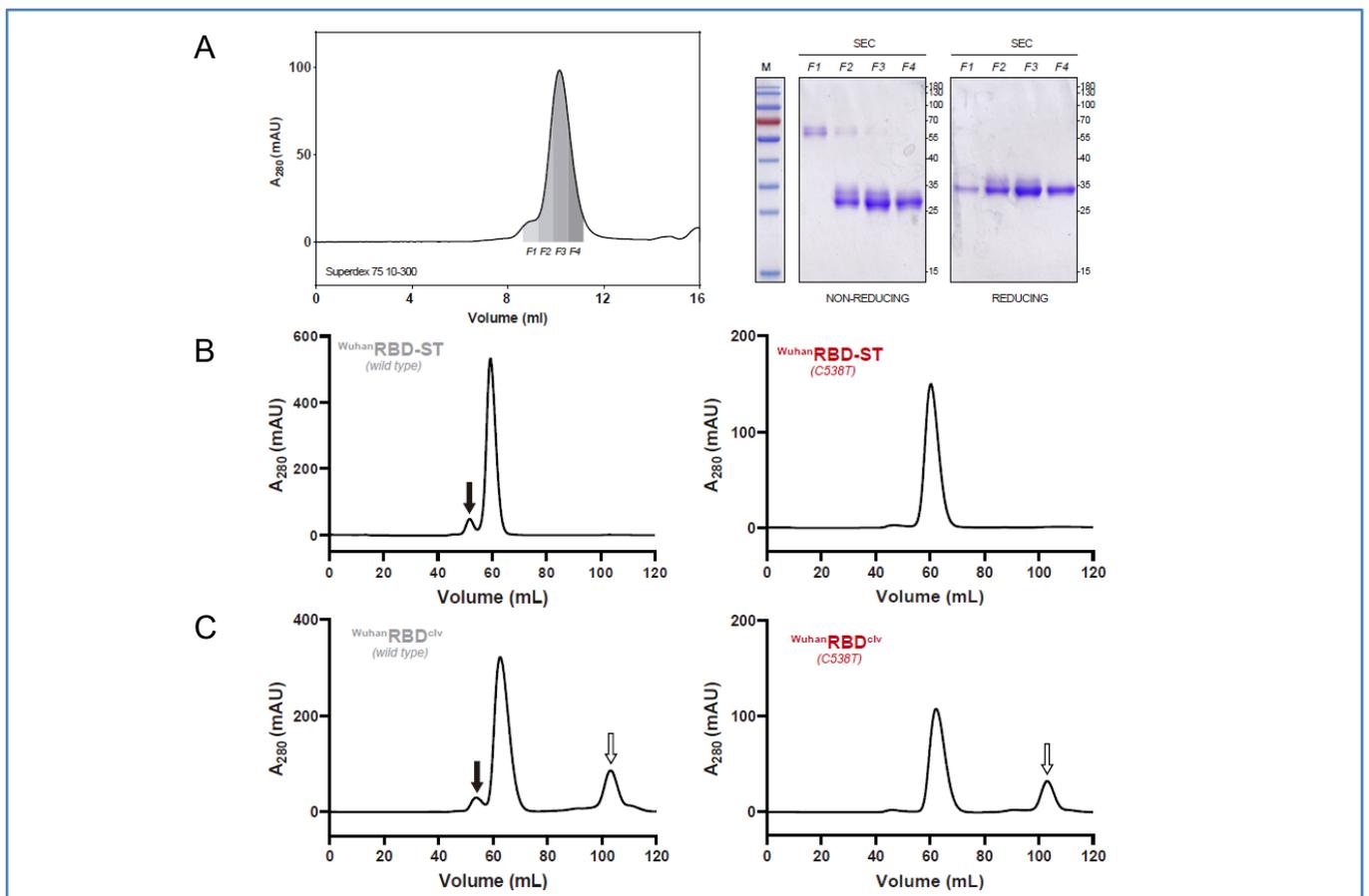
## 4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Producir y caracterizar *in vitro* los RBD de diferentes variantes de preocupación de SARS-CoV-2 (VOCs) con el propósito de desarrollar ensayos alternativos de neutralización para estudiar la respuesta humoral en individuos vacunados.

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1. PRODUCCIÓN DE RBDs DE MÚLTIPLES VARIANTES DE SARS-COV-2 EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA

A nivel del RBD de SARS-CoV-2 existen nueve cisteínas: ocho de ellas forman puentes disulfuros intracatenarios responsables del correcto plegamiento, mientras que el residuo C<sub>538</sub> forma un puente disulfuro con la C<sub>590</sub> de Spike (región C-terminal de S1), permaneciendo desapareado en nuestras construcciones. Tal como se demostró en la sección 2.3.4, este residuo se presenta reducido o cisteinilado en el RBD de células S2. Sin embargo, durante la expresión y secreción, dicho residuo puede formar enlaces con otras cisteínas, dando lugar a oligómeros estabilizados por puentes disulfuro (removibles por SEC tal como se aprecia en la **Figura 26.A**), pero también pudiendo originar plegamientos incorrectos y micro heterogeneidad, afectando el rendimiento y la calidad de las producciones.



**Figura 26: Efecto de la sustitución C538T en la producción del RBD de SARS-CoV-2. A)** Purificación semipreparativa del RBD-ST “wild type” y análisis por SDS-PAGE. Cuatro fracciones fueron colectadas a partir de la SEC semipreparativa, correspondientes a un pico principal precedido de un pico minoritario (izquierda). Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras demostrando que la fracción de alto peso molecular corresponde a agregados estabilizados por puentes disulfuro. **B)** SEC preparativa de dos RBD-ST (izquierda, wt y derecha, C538T). **C)** SEC preparativa de los mismos RBDs luego del tratamiento proteolítico con enteroquinasa para remover el Strep-tag. Las flechas verticales de color negro indican la presencia de oligómeros de RBD estabilizados por puentes disulfuro (solo en la versión wt) mientras que las flechas verticales de color blanco señalan el Strep-tag removido proteolíticamente.

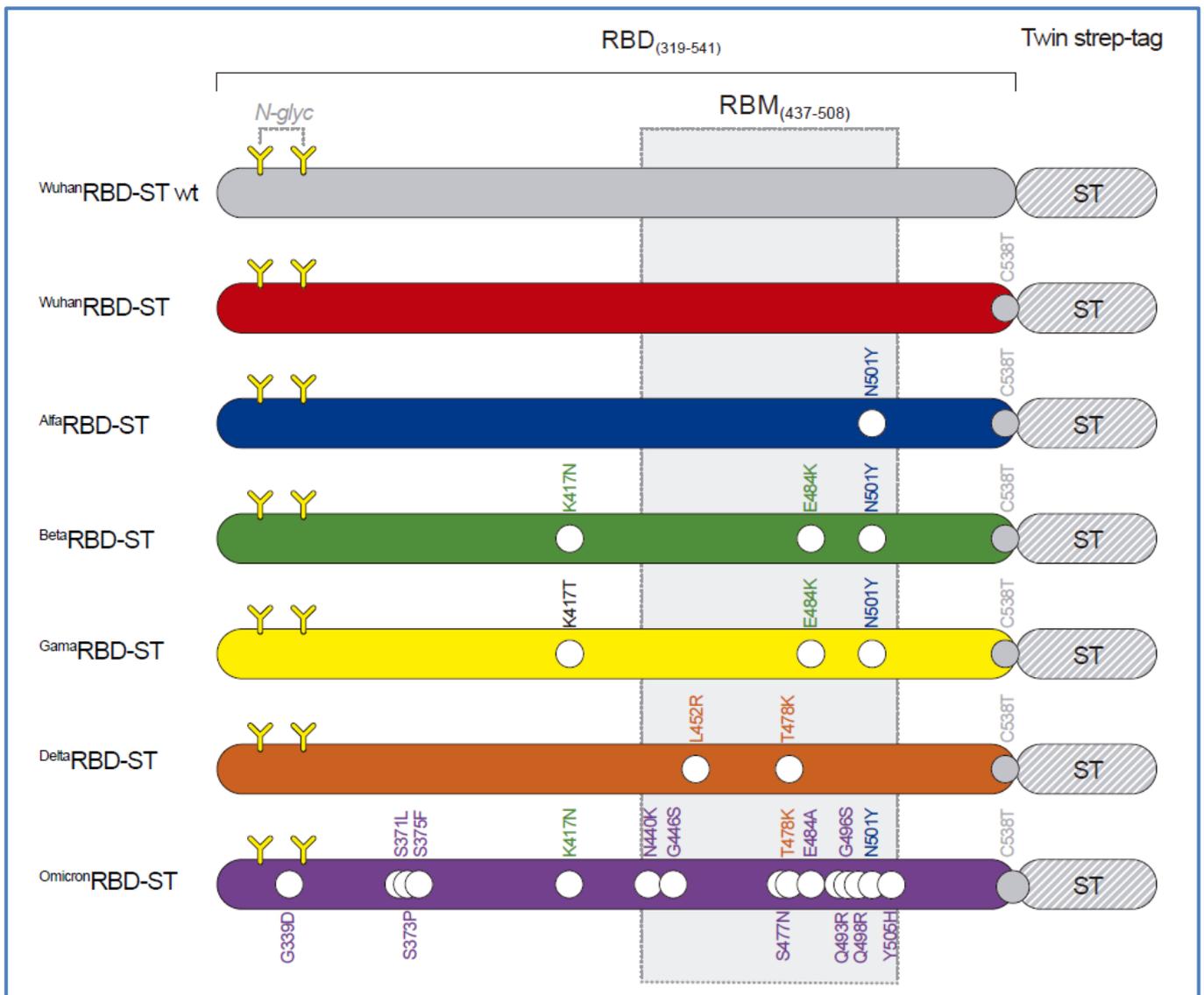
Dado que la C<sub>538</sub> del RBD se encuentra en la cara opuesta al RBM, y por consiguiente no participa de la unión al receptor ACE2, decidimos actualizar nuestra construcción de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST (caracterizada en detalle en el capítulo 2) reemplazando dicha cisteína por un residuo polar (sustitución C538T). En primer lugar, demostramos que esta sustitución no afecta la expresión en células S2, mejorando incluso su comportamiento en solución al disminuir la aparición de oligómeros de alto peso molecular en SEC preparativa (**Figura 26.B**), tal como se ha visto antes con otras sustituciones similares (Klausberger et al., 2022). Además, el comportamiento en solución tras la remoción del *Strep-tag* tampoco mostró cambios respecto de la versión “*wild-type*” (**Figura 26.C**), garantizando su correcto comportamiento en solución.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos incluir la sustitución C538T en el diseño de las construcciones para expresar los RBDs de diversas variantes de preocupación (VOCs). Por simplicidad, a lo largo de este capítulo hemos identificado el RBD de la variante ancestral “*wild-type*” (conteniendo el residuo C<sub>538</sub> no apareado) con su nombre acompañado del sufijo “*wt*”, mientras que la sustitución C538T (presente en el resto de las construcciones) será omitida y dichos RBD serán individualizados únicamente con el prefijo que hace referencia a la VOC correspondiente. Además, cuando el *Strep-tag* (-ST) es escindido mediante tratamiento con EK, sustituimos el sufijo “-ST” por el sufijo superíndice “<sup>clv</sup>”, como en los capítulos anteriores (por ejemplo, <sup>Wuhan</sup>RBD-ST corresponde al RBD de la variante ancestral Wuhan conteniendo la sustitución C538T y el *Strep-tag* en el extremo C-terminal; cuando esta proteína es tratada con EK dará lugar a <sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup>).

Así, generamos construcciones para expresar y purificar los RBDs correspondientes a las VOCs más representativas de SARS-CoV-2 aplicando el protocolo descrito en el capítulo 2 para producirlas en células S2. Las diferentes construcciones con su correspondiente nomenclatura y sustituciones características se resumen en la **Tabla 5** y se representan a escala en la **Figura 27**.

**Tabla 5:** Resumen de las construcciones utilizadas en este trabajo para expresión y purificación de los RBD de diferentes VOCs de SARS-CoV-2 en células S2 de *Drosophila*.

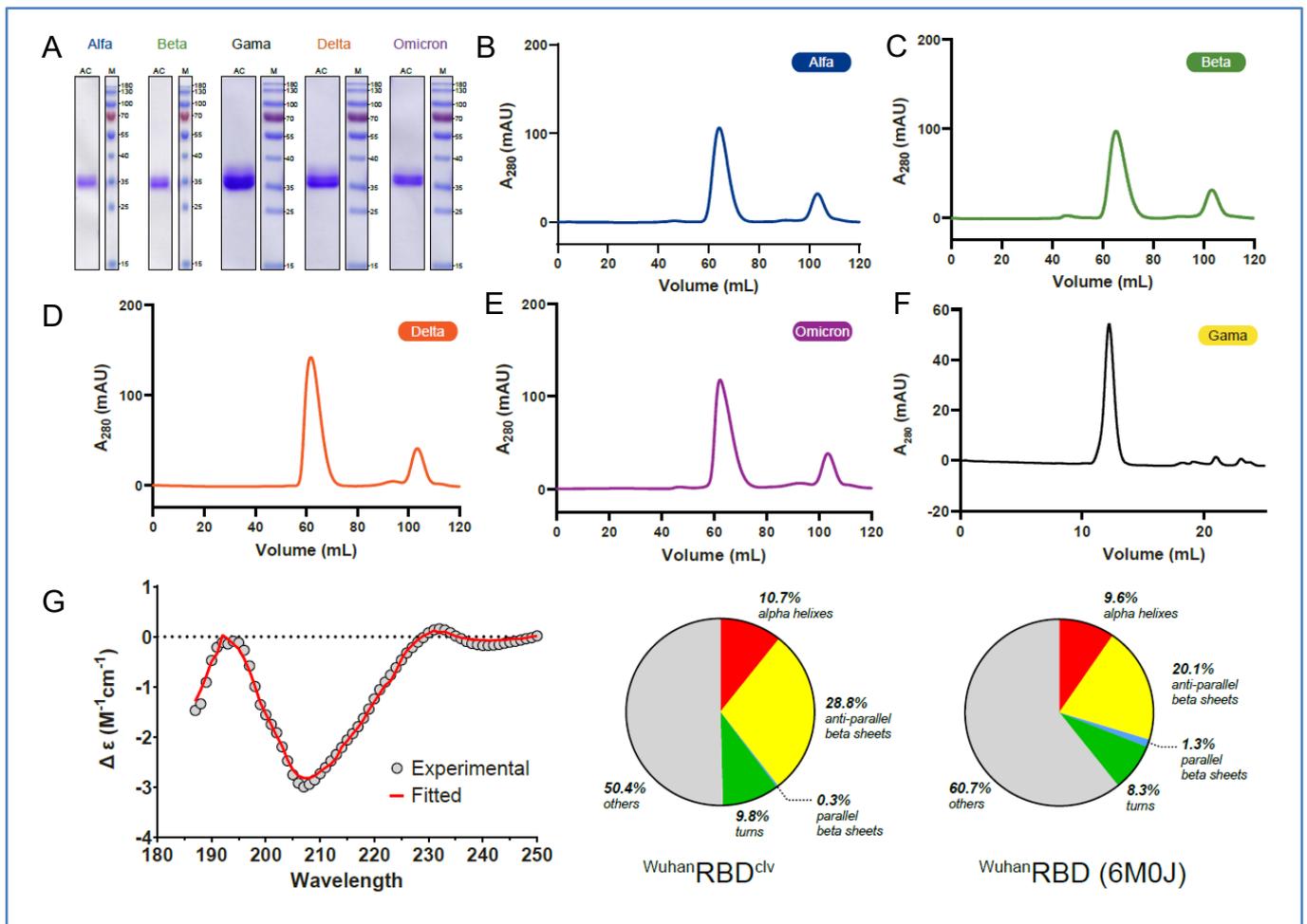
| Construcción    | Linaje    | Identificación         | Sustituciones respecto a Wuhan                                                                                   |
|-----------------|-----------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wuhan           | -         | <sup>Wuhan</sup> RBDwt | -                                                                                                                |
| Wuhan (C538T)   | -         | <sup>Wuhan</sup> RBD   | C538T                                                                                                            |
| Alpha (C538T)   | B.1.1.7   | AlphaRBD               | N501Y, (C538T)                                                                                                   |
| Beta (C538T)    | B.1.351   | BetaRBD                | K417N, E484K, N501Y, (C538T)                                                                                     |
| Gamma (C538T)   | P.1       | GammaRBD               | K417T, E484K, N501Y, (C538T)                                                                                     |
| Delta (C538T)   | B.1.617.2 | DeltaRBD               | L452R, T478K, (C538T)                                                                                            |
| Omicron (C538T) | B.1.1.529 | OmicronRBD             | G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, (C538T) |



**Figura 27:** Diagrama a escala de las construcciones diseñadas para producir los RBD de diferentes VOCs de SARS-CoV-2 en células S2. Las sustituciones características de cada variante se representan con esferas blancas (a excepción de la sustitución C538T introducida por nosotros que se presenta en gris). Además, se presentan con fines orientativos los sitios de N-glicosilación y el RBM.

Los RBDs de las diferentes variantes fueron purificados por cromatografía de afinidad dando lugar a bandas únicas con el peso molecular esperado cuando se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 28.A**). A continuación, las proteínas fueron re-purificadas por SEC incluyendo un paso de remoción proteolítica del *Strep-tag* cuando fue necesario, dando lugar a proteínas con altos niveles de pureza y volúmenes de exclusión acordes con proteínas monoméricas (**Figura 28.B-F**). Los rendimientos de producción fueron variables con promedios que oscilaron entre 25 y 40 mg L<sup>-1</sup>, utilizando volúmenes de cultivo entre 60 y 300 mL. La variante <sup>Gamma</sup>RBD-ST fue la que mostró rendimientos de producción más bajos (entre 5 y 10 mg L<sup>-1</sup>)

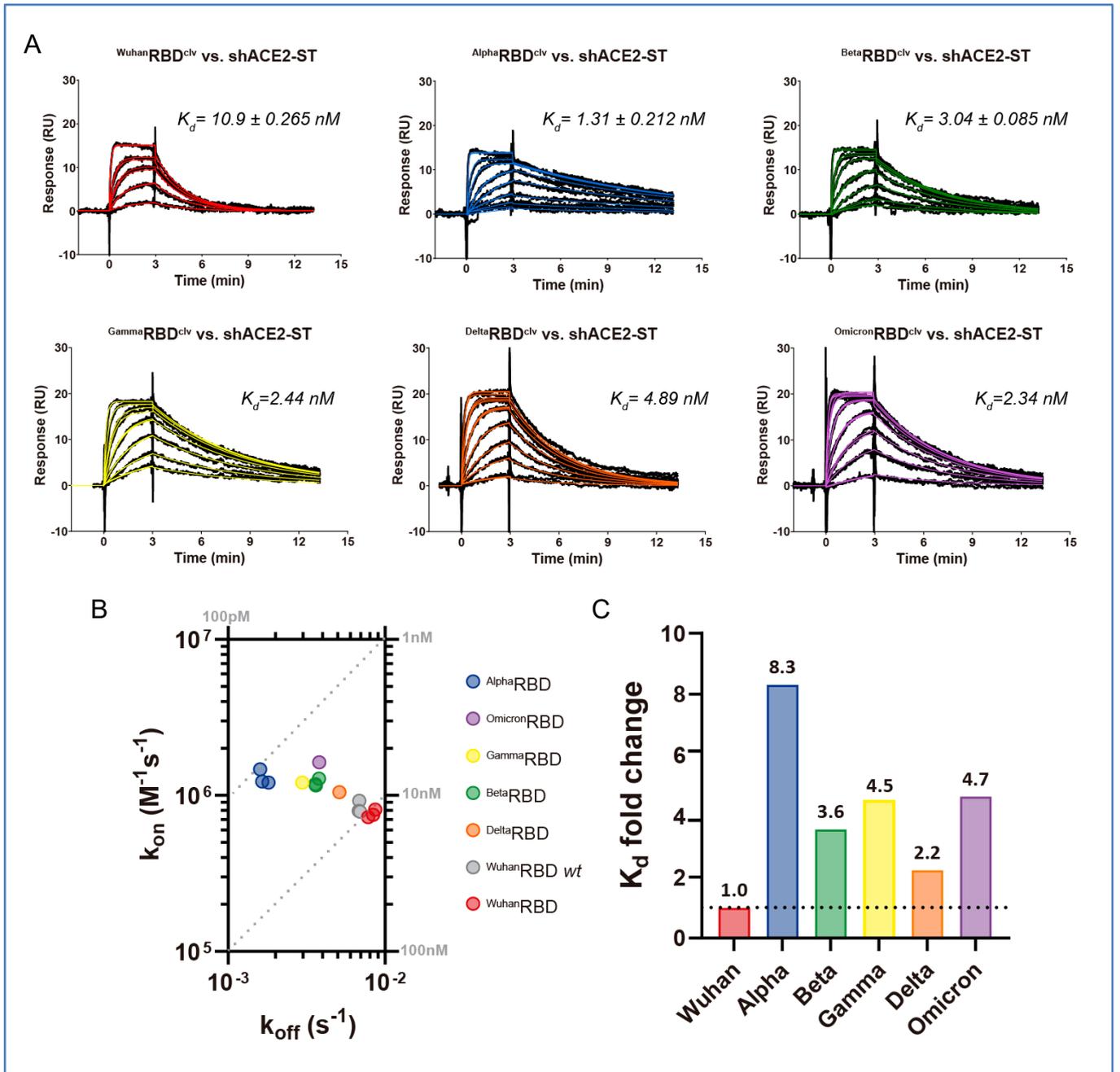
El análisis del  $^{Wuhan}RBD^{clv}$  por dicroísmo circular en el UV lejano (FUV-CD, por “*far-UV circular dichroism*”) permitió evaluar su estructura secundaria mostrando un espectro muy similar al obtenido con RBDs producidos en otros sistemas de expresión como células de mamífero, levaduras y bacterias (Argentinian Anticovid Consortium, 2020; He et al., 2021; Moro-Pérez et al., 2023; Nagar et al., 2023)(**Figura 28.G**). La deconvolución de los datos obtenidos utilizando el algoritmo BeStSel (Micsonai et al., 2018, 2021, 2022) mostró una estructura secundaria conteniendo un 28,8% de hojas beta antiparalelas y un 10,7% de  $\alpha$ -hélices. En forma ortogonal, inferimos la estructura secundaria a partir de los datos estructurales de un RBD producido en el sistema de baculovirus (PDB ID: 6M0J) cuya estructura cristalográfica fue resuelta en complejo con ACE2 (Lan et al., 2020), obteniendo resultados coincidentes y demostrando que la estructura secundaria del RBD producido en células S2 es correcto.



**Figura 28: Purificación de RBDs de SARS-CoV-2 pertenecientes a diferentes VOCs. A)** Análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras de las cinco VOCs purificadas por cromatografías de afinidad (AC). **B-E)** SEC preparativa de los RBDs pertenecientes a las VOCs Alpha, Beta, Delta y Omicron incubados con EK bovina para remover el *Strep-tag* **F)** SEC analítica del  $^{Gamma}RBD^{clv}$  previamente purificado por SEC preparativa después del tratamiento proteolítico con EK bovina. **G)** Análisis de la estructura secundaria del  $^{Wuhan}RBD^{clv}$  por dicroísmo circular en la región del UV-lejano. Se presentan los datos experimentales superpuestos con el ajuste correspondiente utilizando BeStSel (*izquierda*) y los gráficos correspondientes a la deconvolución de dicho ajuste (*medio*) y de los datos estructurales extraídos del PDB 6M0J (cadena B) (*derecha*).

### **4.3.2. ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN CON shACE2 DEMUESTRAN LA FUNCIONALIDAD DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE RBD PRODUCIDAS EN CÉLULAS S2**

Siguiendo la estrategia utilizada en el capítulo 2 para evaluar la afinidad entre RBD y shACE2, capturamos shACE2-ST en la superficie de un chip de SPR (derivatizado con streptactina) y evaluamos la cinética de interacción con todas las variantes de RBD<sup>clv</sup> a 25°C. En todos los casos evidenciamos un aumento de la afinidad con respecto a la variante ancestral (<sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup>), con aumento en las velocidades de asociación (constantes cinéticas de asociación  $k_{on}$  más altas) y velocidades de disociación más lentas (constantes cinéticas de disociación,  $k_{off}$  más bajas) (**Figura 29.A, Tabla 6**).



**Figura 29: Análisis cinético por SPR de la interacción a 25°C entre los RBDs de distintas variantes de SARS-CoV-2 y shACE2-ST.** **A)** Cada panel corresponde a un experimento de SPR llevado a cabo con los RBDs de cada una de las VOC a 25°C. Los sensorgramas correspondientes a inyecciones de RBDs a diferentes concentraciones durante 3 minutos con tiempos de disociación de 10 minutos se presentan superpuestos (líneas negras) con los correspondientes ajustes a un modelo cinético 1:1 en colores siguiendo el criterio de la **Figura 28**. En la parte superior de cada sensorgrama se presentan las especies involucradas en cada experimento (analito vs. ligando) y el valor de la constante de disociación obtenida ( $K_D$ ) se expresa en unidades nM junto a las curvas correspondientes (en aquellos casos que se realizaron réplicas, el valor reportado corresponde al promedio acompañado de su desviación estándar). **B)** Gráfico bidimensional de isoafinidad confeccionado con los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  obtenidos (resumidos en la **Tabla 6**). Las líneas punteadas diagonales de color gris corresponden a los valores de  $K_D$  correspondientes, representados en gris sobre los ejes. El gráfico muestra cómo las afinidades calculadas para las distintas variantes ven aumentada su afinidad en el rango de  $K_D=1-10 \text{ nM}$  respecto de la variante ancestral, fundamentalmente por causa de la disminución en el valor de  $k_{off}$ . **C)** Gráfico de barras mostrando la tasa de cambio en los valores de  $K_D$  obtenidos con las cinco VOCs evaluadas, respecto de la variante ancestral. Los valores correspondientes se presentan en números arriba de cada barra.

**Tabla 6: Parámetros cinéticos de la interacción entre shACE2-ST y diferentes variantes de RBD mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) a 25°C.**

| RBD                     | # experimento | $k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | Rmax (RU) | $K_D$ (M)             | Chi <sup>2</sup> | Promedio $K_D \pm SD$ (nM) |
|-------------------------|---------------|------------------------------|------------------------|-----------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| Wuhan <sup>RBD wt</sup> | 1             | $9.20 \times 10^5$           | $6.90 \times 10^{-3}$  | 10.1      | $7.50 \times 10^{-9}$ | 0.205            |                            |
|                         | 2             | $7.95 \times 10^5$           | $6.81 \times 10^{-3}$  | 16.8      | $8.56 \times 10^{-9}$ | 0.15             | $8.29 \pm 0.692$           |
|                         | 3             | $7.88 \times 10^5$           | $6.93 \times 10^{-3}$  | 21.0      | $8.80 \times 10^{-9}$ | 0.281            |                            |
| Wuhan <sup>RBD</sup>    | 1             | $8.10 \times 10^5$           | $8.66 \times 10^{-3}$  | 13.6      | $1.07 \times 10^{-8}$ | 0.143            |                            |
|                         | 2             | $7.26 \times 10^5$           | $7.82 \times 10^{-3}$  | 20.9      | $1.08 \times 10^{-8}$ | 0.197            | $10.9 \pm 0.265$           |
|                         | 3             | $7.50 \times 10^5$           | $8.4 \times 10^{-3}$   | 27.7      | $1.12 \times 10^{-8}$ | 0.152            |                            |
| Alpha <sup>RBD</sup>    | 1             | $1.47 \times 10^6$           | $1.6 \times 10^{-3}$   | 11.8      | $1.08 \times 10^{-9}$ | 0.162            |                            |
|                         | 2             | $1.21 \times 10^6$           | $1.81 \times 10^{-3}$  | 19.4      | $1.50 \times 10^{-9}$ | 0.153            | $1.31 \pm 0.212$           |
|                         | 3             | $1.23 \times 10^6$           | $1.65 \times 10^{-3}$  | 24.3      | $1.34 \times 10^{-9}$ | 0.166            |                            |
| Beta <sup>RBD</sup>     | 1             | $1.28 \times 10^6$           | $3.79 \times 10^{-3}$  | 12.8      | $2.95 \times 10^{-9}$ | 0.203            |                            |
|                         | 2             | $1.16 \times 10^6$           | $3.62 \times 10^{-3}$  | 20.5      | $3.12 \times 10^{-9}$ | 0.285            | $3.04 \pm 0.085$           |
|                         | 3             | $1.18 \times 10^6$           | $3.59 \times 10^{-3}$  | 25.6      | $3.05 \times 10^{-9}$ | 0.273            |                            |
| Gamma <sup>RBD</sup>    | 1             | $1.21 \times 10^6$           | $2.97 \times 10^{-3}$  | 18.0      | $2.44 \times 10^{-9}$ | 0.136            | 2.44                       |
| Delta <sup>RBD</sup>    | 1             | $1.05 \times 10^6$           | $5.11 \times 10^{-3}$  | 19.8      | $4.89 \times 10^{-9}$ | 0.205            | 4.89                       |
| Omicron <sup>RBD</sup>  | 1             | $1.63 \times 10^6$           | $3.81 \times 10^{-3}$  | 19.4      | $2.34 \times 10^{-9}$ | 0.195            | 2.34                       |

Al comparar los parámetros cinéticos, encontramos que las diferencias a nivel de  $k_{off}$  son las principales responsables de los cambios en la afinidad de las variantes estudiadas, mientras que las diferencias a nivel de  $k_{on}$  tienen un impacto mucho menor (**Figura 29.B**). Dicho efecto es más notorio en las variantes que presentan mayor afinidad como en el caso de <sup>Alpha</sup>RBD, coincidiendo con resultados obtenidos utilizando otros sistemas de expresión (H. Liu, Zhang, et al., 2021).

La sustitución N501Y está presente en el RBM de las variantes Alpha, Beta, Gamma y Omicron, siendo identificada como una de las principales responsables del aumento de la afinidad de unión con hACE2, y por lo tanto, otorgando una ventaja adaptativa sobre la variante ancestral (Gu et al., 2020). Esta sustitución reemplaza el enlace de hidrógeno entre N<sub>501</sub> de RBD y la Y<sub>41</sub> de hACE2, generando una interacción más fuerte vía interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  con la Y<sub>41</sub> y catión- $\pi$  con la K<sub>353</sub> de hACE2 (Tian et al., 2021). En nuestro caso, la variante <sup>Alpha</sup>RBD<sup>clv</sup> presentó un aumento de la  $K_D$  de casi un orden de magnitud con respecto a la variante ancestral (*fold change* 8,3) (**Figura 29.C**), coincidiendo con resultados obtenidos con otros sistemas de expresión (Han et al., 2021).

Por otra parte, las sustituciones adicionales en <sup>Beta</sup>RBD y <sup>Gamma</sup>RBD han sido asociadas al escape inmunitario frente a anticuerpos neutralizantes, mostrando un efecto detrimental sobre la afinidad de unión al receptor (H. Liu, Wei, et al., 2021; Uriu et al., 2021). Las sustituciones del residuo K<sub>417</sub> con carga positiva por residuos polares (N y T en los <sup>Beta</sup>RBD y <sup>Gamma</sup>RBD, respectivamente) y de E<sub>484</sub> con carga negativa por un residuo de lisina positivo, eliminan los puentes salinos con el D<sub>30</sub> y la K<sub>31</sub> de hACE2,

oponiéndose al efecto de la sustitución N501Y. Como resultado, la afinidad de <sup>Beta</sup>RBD y <sup>Gamma</sup>RBD muestra un aumento con respecto a la variante ancestral, pero con magnitudes inferiores a las de <sup>Alpha</sup>RBD. Nuestros resultados muestran que la afinidad de <sup>Beta</sup>RBD y <sup>Gamma</sup>RBD por hACE2 presenta un aumento en los valores de  $K_d$  de 3,6 y 4,4, respectivamente (**Figura 29.C**), en línea con los datos reportados para dichas variantes expresadas en células humanas (Han et al., 2021).

<sup>Delta</sup>RBD es la única VOC que no presenta la sustitución N501Y. En su lugar, presenta dos sustituciones L452R y T478K, responsables de generar una disminución en el reconocimiento por parte de anticuerpos neutralizantes de suero de individuos infectados o vacunados con la variante ancestral (Planas, Veyer, et al., 2021). Además, los residuos L<sub>452</sub> y T<sub>478</sub> (que no establecen contactos moleculares con ACE2 en el <sup>Wuhan</sup>RBD a pesar de estar ubicados dentro de la secuencia primaria del RBM), son reemplazados por residuos positivos (arginina y lisina, respectivamente), originando nuevas interacciones que aumentan la afinidad por el receptor. El residuo de arginina (R<sub>452</sub>) genera interacciones electrostáticas con un parche negativo de hACE2 que involucra residuos de ácido glutámico y aspártico, mientras que la sustitución por una lisina (K<sub>478</sub>) da lugar a un puente de hidrógeno débil con el residuo Q<sub>24</sub> de hACE2. Como consecuencia, <sup>Delta</sup>RBD presenta un moderado aumento al doble en la afinidad por hACE2 (H. Liu, Wei, Aviszus, et al., 2022), en total concordancia con nuestros resultados que muestran un aumento de 2,2 en el valor de la  $K_d$  (**Figura 29.C**).

Por último, el RBD de la variante Omicron presenta 15 sustituciones (10 de ellas ubicadas en el RBM), siendo esta alta tasa de mutación identificada como una ventaja para evadir la respuesta por anticuerpos neutralizantes, al tiempo de favorecer su transmisibilidad (Dejnirattisai et al., 2022).

Diversas sustituciones como N501Y (responsable del aumento de la afinidad de las variantes Alpha, Beta y Gamma), T478K (participando en el aumento de la afinidad de <sup>Gamma</sup>RBD) y otras como S477N, G496S y Q498R (Han et al., 2022; Starr, Greaney, Hilton, et al., 2020) están presentes en <sup>Omicron</sup>RBD y son responsables de aumentar la afinidad por el receptor. Sin embargo, otras sustituciones (como H505Y y K417N) actúan de manera opuesta, resultando en un efecto de epistasis sobre la afinidad de <sup>Omicron</sup>RBD (Barre et al., 2022; Moulana et al., 2023). Algunos trabajos han demostrado que la acumulación de sustituciones en el RBM de <sup>Omicron</sup>RBD resulta en un leve incremento en la afinidad (L. Li et al., 2022; Nutalai et al., 2022), mientras que otros trabajos han mostrado aumentos variables en la afinidad de <sup>Omicron</sup>RBD en el entorno de 3 a 16 veces, respecto de la variante Wuhan (Cameroni et al., 2022; Forest-Nault et al., 2022; Meng et al., 2022). Nuestra caracterización por SPR muestra que el <sup>Omicron</sup>RBD expresado en células S2 presenta un aumento en el valor de  $K_d$  de 4,7, cercano al aumento observado con <sup>Gamma</sup>RBD (**Figura 29.C**).

En resumen, nuestra caracterización cinética demuestra que todos los RBDs producidos en células S2 presentan afinidades en acuerdo con la literatura y que los cambios relativos en las afinidades respecto a la variante ancestral van en línea con los datos reportados (Cameroni et al., 2022). Además, nuestros resultados sugieren un efecto nulo de la sustitución C538T, demostrando la utilidad de nuestras construcciones para reconstruir el perfil de afinidades por la proteína receptora y su importancia para representar *in vitro* la interfaz virus-célula de las variantes de SARS-CoV-2.

### 4.3.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DE UNIÓN DE LAS VARIANTES DE RBD A SHACE2.

De manera análoga, realizamos experimentos de SPR a 37°C para analizar la cinética de unión con shACE2 utilizando RBDs de tres variantes que cubren el espectro de afinidades: <sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup> (baja), <sup>Alpha</sup>RBD<sup>clv</sup> (alta) y <sup>Beta</sup>RBD<sup>clv</sup> (intermedia). Los resultados del análisis cinético demuestran que el aumento de la temperatura supone una aceleración de los fenómenos de asociación y disociación (valores  $k_{on}$  y  $k_{off}$  más altos), mostrando un predominio de esta última que resulta en una reducción global de las afinidades obtenidas con las 3 variantes (valores de  $K_d$  más altos) (Figura 30.A-B).

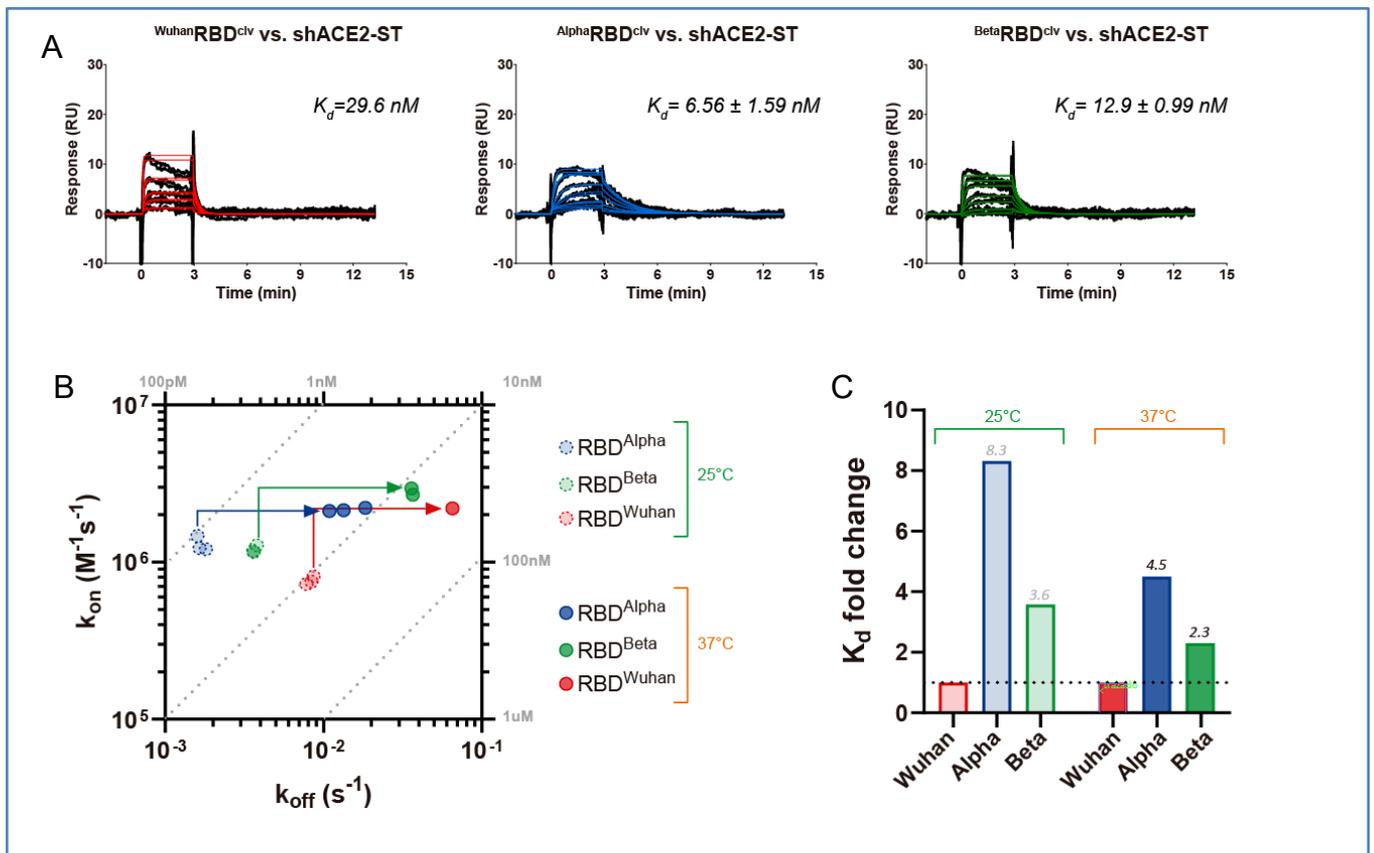


Figura 30: : Análisis cinético por SPR y comparación de la interacción a 37°C entre los RBDs de distintas variantes de SARS-CoV-2 y shACE2-ST. A) Cada panel corresponde a un experimento de SPR llevado a cabo con los RBDs de las VOC Wuhan, Alpha y Beta a 37°C. Los sensorgramas correspondientes a inyecciones de RBDs a diferentes concentraciones durante 3 minutos con tiempos de disociación de 10 minutos se presentan superpuestos (líneas negras) con los correspondientes ajustes a un modelo cinético 1:1 en colores siguiendo el criterio de la Figura 28. En la parte superior de cada sensorgrama se presentan las especies

involucradas en cada experimento (analito vs. ligando) y el valor de la constante de disociación obtenida ( $K_D$ ) se expresa en unidades nM junto a las curvas correspondientes (en aquellos casos que se realizaron réplicas, el valor reportado corresponde al promedio acompañado de su desviación estándar). **B)** Gráfico bidimensional de isoafinidad confeccionado con los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  obtenidos a 37°C (resumidos en la **Tabla 7**) manteniendo las mismas representaciones gráficas de la **Figura 29.B**. El gráfico muestra las afinidades calculadas a 25°C y 37°C y las trayectorias de los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  medidos a ambas temperaturas. **C)** Gráfico de barras mostrando las tasas de cambio (a 25 y 37°C) en los valores de  $K_D$  obtenidos con las dos VOCs evaluadas, respecto de la variante ancestral. Los valores correspondientes se presentan en números arriba de cada barra.

**Tabla 7: Parámetros cinéticos de la interacción entre shACE2-ST y diferentes variantes de RBD mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) a 37°C.**

| RBD              | # experimento | $k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ ) | Rmax (RU) | $K_D$ (M)             | $\chi^2$ | Promedio $K_D \pm SD$ (nM) |
|------------------|---------------|------------------------------|------------------------|-----------|-----------------------|----------|----------------------------|
| <i>Wuhan</i> RBD | 1             | $2.20 \times 10^6$           | $6.53 \times 10^{-2}$  | 7.61      | $2.96 \times 10^{-8}$ | 0.187    | 29.6                       |
|                  | 1             | $2.22 \times 10^6$           | $1.84 \times 10^{-2}$  | 4.93      | $8.28 \times 10^{-9}$ | 0.160    |                            |
| <i>Alpha</i> RBD | 2             | $2.12 \times 10^6$           | $1.09 \times 10^{-2}$  | 6.26      | $5.14 \times 10^{-9}$ | 0.191    | $6.56 \pm 1.59$            |
|                  | 3             | $2.14 \times 10^6$           | $1.34 \times 10^{-2}$  | 8.23      | $6.26 \times 10^{-9}$ | 0.156    |                            |
| <i>Beta</i> RBD  | 1             | $2.95 \times 10^6$           | $3.59 \times 10^{-2}$  | 7.84      | $1.22 \times 10^{-8}$ | 0.224    | $12.9 \pm 0.99$            |
|                  | 2             | $2.69 \times 10^6$           | $3.67 \times 10^{-2}$  | 9.27      | $1.36 \times 10^{-8}$ | 0.337    |                            |

A pesar de la disminución en las afinidades por efecto de la temperatura, las variantes Alpha y Beta continuaron mostrando afinidades superiores a la variante ancestral, con un claro predominio de la primera, tal como observamos en los experimentos realizados a 25°C. Cuando comparamos la variación relativa de los valores de  $K_D$  respecto a la variante ancestral (medidos a 25 y 37°C) encontramos una caída en la tasa de cambio de 8,3 a 4,5 con la variante Alpha y de 3,6 a 2,3 con la variante Beta (**Figura 30.C**), demostrando que el aumento de temperatura causa una disminución de las afinidades, al tiempo que las diferencias entre variantes se hacen menos evidentes tal como se ha reportado anteriormente (Forest-Nault et al., 2022).

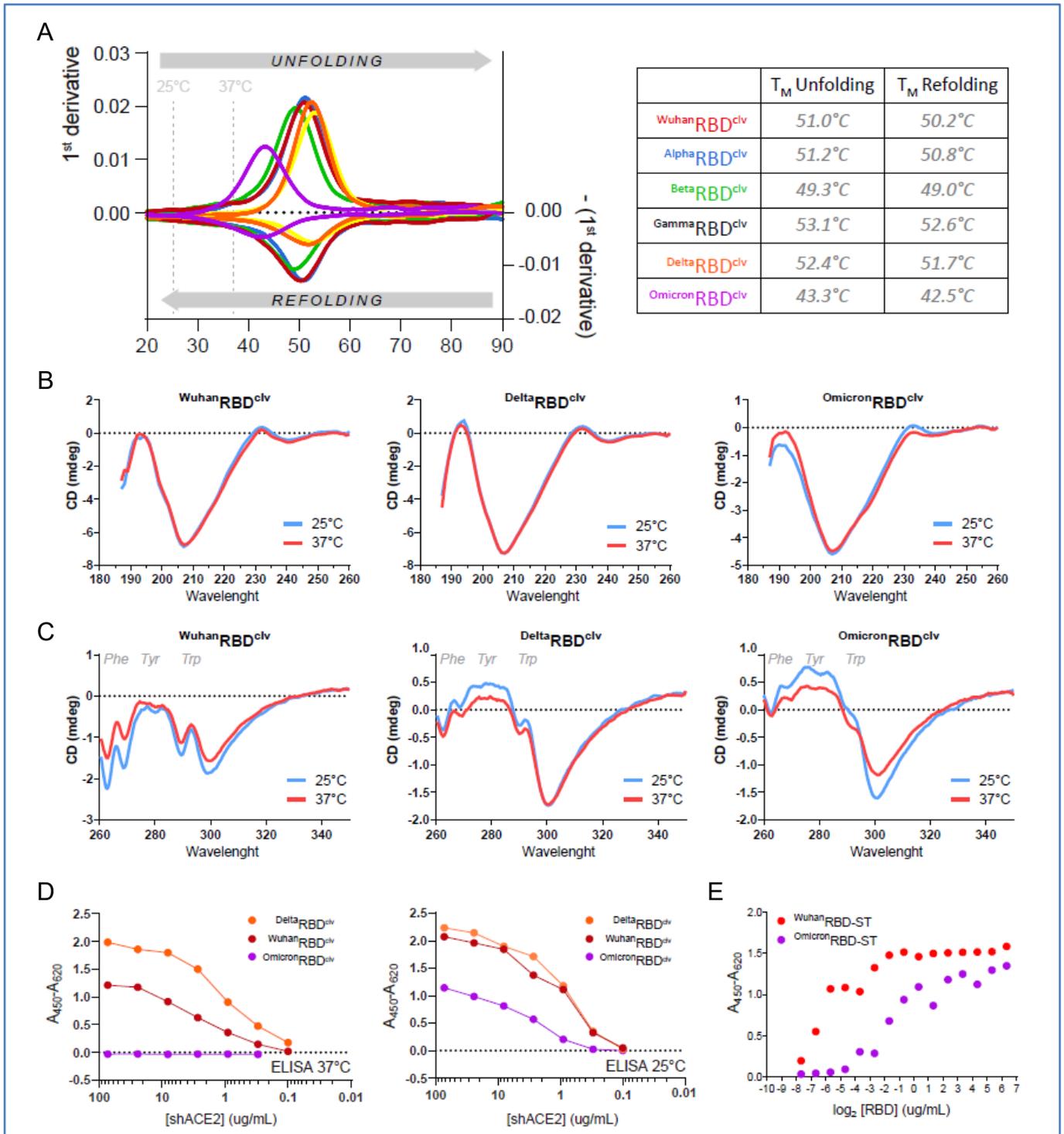
Esta caracterización de la interacción a 37°C sugiere que la optimización de ELISAs de competición con RBDs de VOCs y ACE2 realizados a temperaturas fisiológicas, podría favorecer la unión de anticuerpos séricos bivalentes, proporcionando un escenario más realista y reduciendo los tiempos experimentales. Realizamos varios intentos por obtener datos de SPR a 37°C con *Omicron*RBD<sup>clv</sup>, no obstante los resultados de SPR resultaron poco reproducibles y ruidosos, probablemente por causa de una reducción en la estabilidad de la proteína a 37°C que genera agregación o interacciones inespecíficas con la superficie.

#### **4.3.4. LA MENOR TERMOESTABILIDAD DE *Omicron*RBD CONDICIONA EL DISEÑO DE LOS sVNTs.**

Se realizaron estudios de desnaturalización térmica por nanoDSF con todas los RBDs producidas en células S2, evidenciando transiciones térmicas reversibles en todos los casos con valores de  $T_M$  entre 49,0 y 53,1

°C excepto <sup>Omicron</sup>RBD que mostró valores de  $T_M$  entre 42,5 y 43,3 °C (**Figura 31.A**). Esta disminución de la termoestabilidad de <sup>Omicron</sup>RBD ha sido bien documentada en otros sistemas de expresión y descrita como una consecuencia directa de la acumulación de sustituciones (Lin et al., 2022; Yi et al., 2022). Si bien el valor de  $T_M$  de <sup>Omicron</sup>RBD se encuentra por encima de 37°C, la comparación de las curvas de desnaturalización de las distintas variantes muestra que el inicio de la transición ( $T_{ON}$ ) de esta variante ocurre por debajo de este valor, y que dicha inestabilidad podría estar vinculada con la calidad y reproducibilidad de los experimentos de SPR realizados con esta variante a 37°C (sección anterior).

Por otro lado, evaluamos el efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de <sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup>, <sup>Delta</sup>RBD<sup>clv</sup> y <sup>Omicron</sup>RBD<sup>clv</sup> mediante análisis por FUV-CD a 25°C y 37°C, obteniendo espectros similares a pesar de la diferencia de temperatura. A nivel de Wuhan y Delta casi no se observan diferencias a 25 y 37 °C, mientras que Omicron presenta algunas diferencias mínimas en los espectros de CD. Estos resultados sugieren que, aunque Omicron puede mostrar niveles de inestabilidad algo mayores, la estructura secundaria de los RBDs se mantiene en este rango de temperaturas (**Figura 31.B**). Para buscar posibles cambios a niveles estructurales superiores, comparamos los espectros de dicroísmo circular en la región UV-cercano (NUV-CD, por “*near-UV circular dichroism*”), donde encontramos diferencias a 25 y 37°C asociadas a cambios en el ambiente local de residuos aromáticos (**Figura 31.C**). Estos cambios, que podrían estar vinculados a un aumento de la movilidad del esqueleto proteico por causa de la temperatura, son claros en <sup>Omicron</sup>RBD pero también se evidencian en las otras variantes ensayadas, no pudiendo extraer conclusiones claras respecto a la mayor inestabilidad estructural del RBD de la variante Omicron.



**Figura 31: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de OmicronRBD.** A) A la izquierda se presenta el análisis de termoestabilidad por nanoDSF, de los RBD<sup>clv</sup> de las 6 variantes producidas. Se presentan las derivadas de las curvas de fluorescencia en función de la temperatura para la desnaturalización y re-naturalización (*valores multiplicados por -1*). A la derecha se resumen los valores de T<sub>M</sub> calculados para cada variante a partir de las respectivas curvas de desnaturalización y renaturalización. B) Espectros de FUV-CD de los RBDs de tres variantes medias a 25°C y 37°C. C) Espectros de NUV-CD de los RBDs de tres variantes medidos a 25°C y 37°C. Las regiones del espectro correspondientes a los residuos aromáticos se indican en la parte superior con el nombre de los aminoácidos correspondientes. D) Resultados de ELISAs realizados a 25 y 37°C con los RBD<sup>clv</sup> de tres variantes (Wuhan, Delta y Omicron) inmovilizados en placas e incubadas con concentraciones crecientes de shACE2-ST en presencia de streptactina-HRP. E) Resultado de ELISA realizados a 25°C con los RBD-ST de dos variantes (Wuhan y Omicron) inmovilizados en placas e incubadas con concentraciones crecientes de Streptactina-HRP.

Por último, realizamos experimentos de tipo ELISAs inmovilizando tres variantes de RBD (WuhanRBD<sup>clv</sup>, DeltaRBD<sup>clv</sup> y OmicronRBD<sup>clv</sup>) a 25°C y 37°C, y evidenciando su unión con shACE2-ST en solución a

concentraciones crecientes (**Figura 31.D**). Cuando los RBDs fueron inmovilizados a 37°C, encontramos que  $\Delta\text{RBD}^{\text{clv}}$  mostró una señal mayor respecto de  $\text{WuhanRBD}^{\text{clv}}$ , mientras que no fue posible detectar interacción entre  $\text{OmicronRBD}^{\text{clv}}$  y ninguna de las diluciones de shACE2-ST ensayadas. Por su parte, cuando la sensibilización de las placas de ELISA se realizó a 25°C, la señal obtenida con  $\text{OmicronRBD}^{\text{clv}}$  fue notoriamente inferior a las demás, a pesar de tener una mayor afinidad por el receptor. Cuando inmovilizamos  $\text{WuhanRBD-ST}$  y  $\text{OmicronRBD-ST}$  en placas de ELISA a 25°C y evidenciamos en forma directa su unión a Streptactina-HRP, encontramos que la señal alcanzada con el RBD de Omicron era notoriamente inferior a la obtenida con la variante ancestral, a pesar de haber utilizado concentraciones idénticas durante la inmovilización (**Figura 31.E**).

En conjunto, estos resultados terminan por confirmar que la estabilidad conformacional de  $\text{OmicronRBD}$  se ve afectada a 37°C y que su funcionalidad puede ser drásticamente comprometida cuando es inmovilizado en placas de ELISA, afectando su unión a ACE2 pero también comprometiendo los niveles de proteína inmovilizada, y en consecuencia, su reconocimiento antigénico en ensayos comparativos entre variantes.

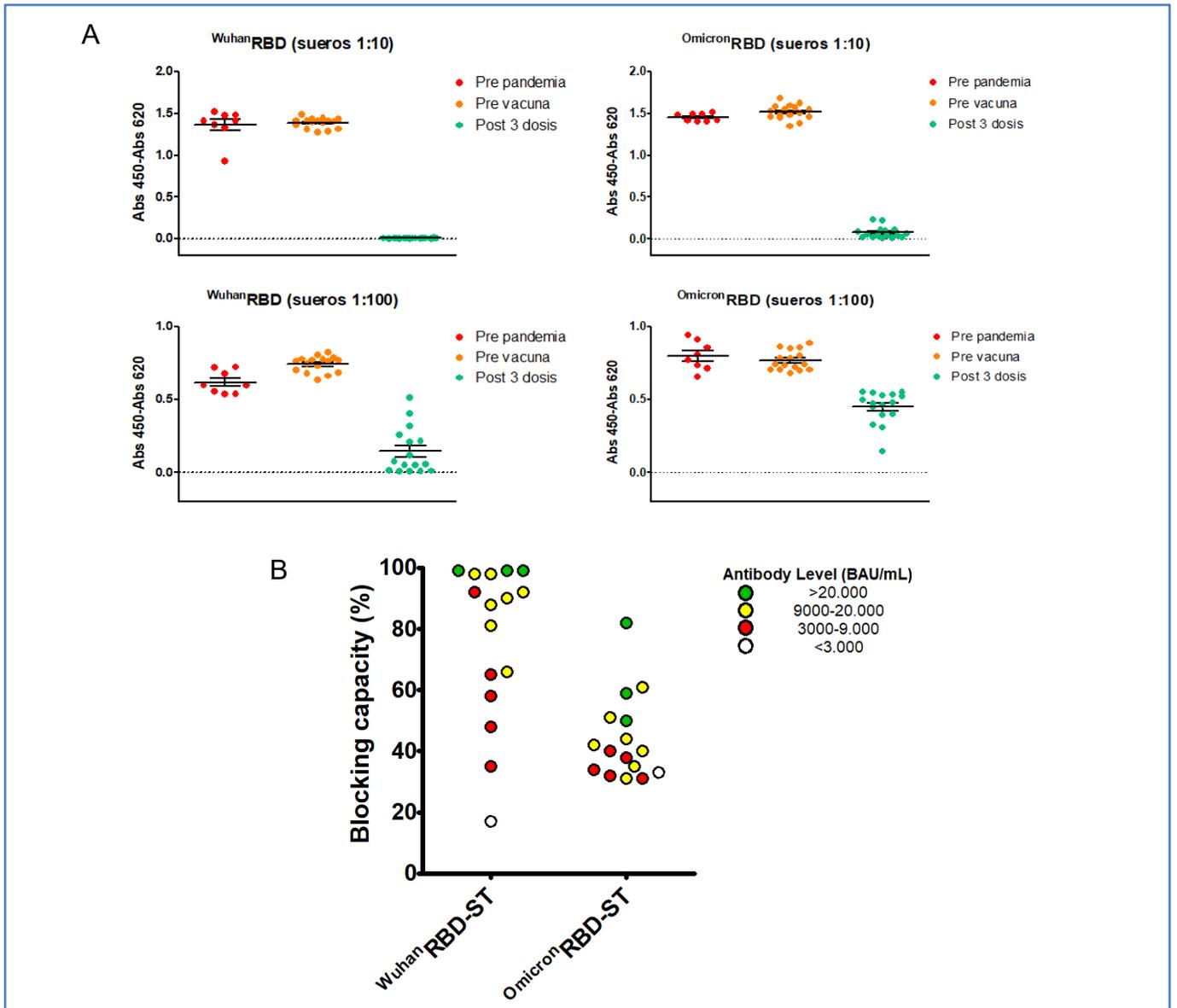
#### **4.3.5. OPTIMIZACIÓN DE UN ELISA DE COMPETICIÓN PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE SUEROS HUMANOS EN FORMA ALTERNATIVA (SVNT).**

El diseño de ensayos alternativos de neutralización (sVNTs) con RBDs de diferentes variantes inmovilizados en placa tiene la ventaja operativa de utilizar diluciones únicas de ACE2 y sueros para comparar la capacidad de bloqueo frente a diversas variantes virales. Sin embargo, las diferencias de performance descritas en la sección anterior (sobre todo con la variante Omicron) hace que los estudios comparativos entre variantes sean difíciles de interpretar, corriendo el riesgo de sobreestimar la capacidad neutralizante de los sueros como consecuencia de la caída en la interacción con ACE2. Por tal motivo, y teniendo en cuenta la importancia de la variante Omicron en la evolución de la pandemia, decidimos avanzar en el desarrollo de los sVNTs inmovilizando el receptor ACE2 en placas de ELISA y utilizando los RBD-ST en solución (revelados con Streptactin-HRP).

Para ello, decidimos sensibilizar placas de ELISA con el ectodominio dimérico de hACE2 fusionado a un Fc humano (producido en células de mamífero Expi293 y proporcionado por el Dr. Agustín Correa). Esta construcción contiene el ectodominio completo de ACE2 humana (incluyendo los residuos 18 al 740) y se expresa como una versión dimérica de hACE2 (con un dominio Fc en el extremo C-terminal). De este modo, y tras pre-incubar los RBD-ST con streptactina-HRP en presencia de sueros humanos, buscamos evaluar la capacidad de estos para impedir la interacción de los RBDs y la hACE2-Fc inmovilizada.

Primero hicimos pruebas para verificar la interacción de hACE2-Fc inmovilizado y los RBD-ST optimizando las condiciones experimentales para reducir la señal inespecífica de *background* y maximizar la relación señal-ruido. Para ello se probaron diferentes cantidades de hACE2-Fc inmovilizada, distintos agentes bloqueantes, diluyentes, condiciones y tiempos de lavado, y distintas diluciones de los RBD-ST y de streptactina-HRP. Una vez definidas las condiciones de los ensayos, evaluamos la respuesta en ausencia de suero utilizando streptactina-HRP sola o en presencia de los RBD-ST de Wuhan y Omicron. La reacción colorimétrica obtenida con streptactina-HRP en ausencia de RBDs fue nula, mientras que cuando se incubó con los RBD-ST se obtuvo una señal de absorbancia significativa. Además, encontramos que la señal obtenida en presencia de Omicron es mayor a la de Wuhan, en total concordancia con las afinidades calculadas.

A continuación evaluamos la capacidad inhibitoria de diferentes sueros humanos diluidos 1:10 y 1:100. Para ello utilizamos dos conjuntos de sueros humanos negativos para SARS-CoV-2 (8 sueros colectados antes del inicio de la pandemia y 16 sueros colectados justo antes del inicio de la campaña de vacunación) y sueros humanos positivos (16 sueros de individuos sometidos a un programa de vacunación heteróloga, colectados luego de recibir la tercera dosis). Los resultados del ELISA muestran que los sueros obtenidos antes del inicio de la pandemia y los sueros obtenidos previo al inicio de la vacunación (negativos para SARS-CoV-2) son incapaces de bloquear la interacción de los RBD-ST de las variantes Wuhan y Omicron, mientras que los sueros colectados luego de recibir la tercera dosis de vacunación heteróloga muestran capacidad bloqueante para ambas variantes virales. Con diluciones de sueros 1:10, las diferencias entre Wuhan y Omicron resultan no significativas, no obstante, la disminución frente a la variante Omicron se hace mucho más evidente con diluciones 1:100 (**Figura 32.A**).



**Figura 32: Análisis de la capacidad de bloquear la interacción RBD-ACE2 en sueros humanos, mediante el uso de los sVNTs desarrollados “in house”. A)** Resultados de ELISA de competición utilizando sueros humanos diluidos 1:10 (*arriba*) y 1:100 (*abajo*). Los sueros pre vacuna y post tercera dosis (*anaranjados* y *verdes*) corresponden a los mismos individuos. **B)** Presentación de los resultados del ELISA de competición en términos de capacidad de bloqueo. Los resultados de absorbancia obtenidos con diluciones 1:100 de sueros de individuos vacunados con 3 dosis fueron normalizados respecto a la señal obtenida en ausencia de RBDs (100%) y la señal promedio obtenida con los RBDs incubados con sueros negativos (0%). Los datos se presentan para las variantes Wuhan y Omicron, y los valores individuales son estratificados e identificados con un código de colores de acuerdo con los niveles de anticuerpos detectados.

Los resultados obtenidos con nuestro ensayo alternativo de neutralización coinciden con lo reportado en la literatura, que encuentra en los *boosters* con vacunas a ARN una estrategia para amortiguar esta disminución de la actividad neutralizante para Omicron (García-Beltrán et al., 2022). El análisis comparativo de nuestros resultados por ELISA de competición frente a los análisis de niveles de anticuerpos específicos contra la variante Wuhan (capítulo anterior) muestra una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos y la capacidad de bloqueo de la interacción RBD:hACE2 frente a ambas variantes (**Figura 32.B**).

## 4.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En primer lugar, los resultados presentados en este capítulo muestran que la expresión y purificación de RBDs de diferentes variantes virales en células S2 de *Drosophila* son una herramienta muy confiable, describiendo de manera fiel el abanico de afinidades por el receptor celular ACE2 de las diferentes variantes virales de SARS-CoV-2.

Además, nuestros resultados demuestran que las numerosas sustituciones en <sup>Omicron</sup>RBD son también responsables de su susceptibilidad frente a la temperatura y la inmovilización a un soporte sólido, debiendo ser tenidas en cuenta al momento de diseñar ensayos para medir la interacción con su receptor hACE2 e incluso para ser utilizados como antígenos en ensayos serológicos comparativos entre variantes.

La optimización de ensayos sVNT utilizando el *tag* de purificación de los RBDs para revelar su interacción con ACE2 (sin necesidad de llevar a cabo reacciones de conjugación que puedan afectar la interacción con el receptor o la estabilidad de las proteínas), permitió estudiar la capacidad bloqueante de los sueros humanos frente a dos variantes de SARS-CoV-2. Si bien para hablar de neutralización es necesario llevar a cabo una validación utilizando métodos que realmente detecten y cuantifiquen la actividad neutralizante, nuestros resultados obtenidos mediante diversos encares metodológicos muestran resultados coherentes entre sí, que se ajustan perfectamente con la bibliografía.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, resulta interesante llevar a cabo estudios futuros de respuesta humoral aplicando los ensayos alternativos desarrollados en este capítulo, con el fin de evaluar la respuesta frente a diversas variantes durante un período más largo de tiempo, que incluya el efecto de inmunizaciones posteriores tanto por vacunas como por infecciones virales. Además, los ensayos serológicos desarrollados en este capítulo son adaptables a diversos agentes neutralizantes, resultando sumamente atractivos como herramienta para identificar compuestos de bajo peso molecular con actividad neutralizante (*drug-discovery*) y también para medir actividad neutralizante en otras especies (posibles reservorios de infección o animales inmunizados con la proteína Spike o sus dominios).

## 4.5. METODOLOGÍA

### 4.5.1. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Para la generación de construcciones plasmídicas capaces de producir los RBD de diferentes VOCs se utilizó la secuencia de ADN que codifican los aminoácidos 319-541 de la glicoproteína Spike de SARS-CoV-2 (Wuhan) (GenBank: MN908947.3), introduciendo mutaciones para generar los mutantes descritos en la **Tabla 5** (incluyendo la sustitución C538T). Al igual que con el RBD de Wuhan, todas las construcciones se diseñaron fusionados a un sitio de corte de enteroquinasa bovina en el extremo C-terminal, seguido de un Twin-Strep-tag® (IBA) y un codón STOP. Las secuencias fueron optimizadas para el uso de codones de *Drosophila melanogaster* y sintetizados por Genscript y los genes sintéticos se clonaron en un vector de expresión pMT/V5-His (Invitrogen) inmediatamente después de la secuencia BiP, tal como se describió previamente (Krey et al., 2010) y se resume en la **Figura 27**. Por su parte, la secuencia de ADN que codifica el ectodominio (residuos 18-740 incluyendo el dominio de dimerización) de la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (hACE2) (GenBank: BAB40370. 1) fue clonada en un vector pCMV-Ext (Ortega et al., 2018), fusionada a la secuencia codificante de los dominios CH2 y CH3 de IgG humana (dispuestos en tándem en extremo C-terminal) para dar lugar al ectodominio de hACE2 fusionado a un Fc.

### 4.5.2. PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Se obtuvieron líneas celulares S2 estables que expresan los RBD-ST de distintas VOCs mediante co-transfección con el respectivo vector de expresión y un plásmido de selección por puromicina (pCoPuro). Para las construcciones correspondientes a los RBD de Wuhan, Alpha, Beta y Gamma se utilizó el reactivo Effectene (QIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para los RBD correspondientes a las variantes Gamma y Omicron se utilizó un electroporador de alta eficiencia Maxcyte STx, utilizando 200 µg/mL plásmido de expresión y 100 µg/mL de plásmido de selección en cubetas OC-400. Las células transfectadas se seleccionaron a 28°C en medio Insect Xpress (LONZA) complementado con 6 µg/mL de puromicina. Las líneas celulares S2 estables se cultivaron en matraces de vidrio a 28°C con agitación a 110 rpm en un agitador orbital estándar y se indujeron a  $5 \times 10^6$  células/mL con 5 µM  $\text{CdCl}_2$ . Tras cuatro días de inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 150 g durante 5 minutos, y ambas proteínas se purificaron desde el sobrenadante del cultivo por cromatografía de afinidad (AC). Para ello, el sobrenadante se centrifugó a 6.000 g, se filtró a través de 0,22 µm y se cargó en una columna Strep-Tactin®XT 4Flow® de 5mL (IBA) equilibrada en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para remover el Strep-tag, las muestras se incubaron overnight a 25°C con enteroquinasa-His (Genscript) (a 20 U mg<sup>-1</sup>), luego incubadas con Ni-Sepharose (Cytiva) y purificadas

por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en buffer de almacenamiento, utilizando columnas Superdex 75 (Cytiva). Finalmente, las muestras fueron sometidas a un segundo paso de purificación por AC en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA (buffer de almacenamiento) y la fracción no unida colectada y filtrada por 0,22  $\mu\text{m}$ .

La shACE2-ST y shACE2<sup>clv</sup> fueron producidas tal como se describe en el capítulo 2 (sección 2.5.2) mientras que la hACE2-Fc dimérica (utilizada en los ELISA de competición) fue clonada y producida por el Dr. Agustín Correa de la Unidad de Ingeniería de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo y cordialmente cedida para tales fines. Brevemente, la hACE2-Fc fue producida en células Expi293 de mamífero y purificada por cromatografía de afinidad a través de unión a Proteína A.

### **4.5.3. ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO DE LAS PROTEÍNAS**

Las proteínas purificadas se sometieron a SDS-PAGE al 12% (con DTT 0,1M) y se analizaron por tinción con Coomassie. Para evaluar el tamaño de las proteínas en solución se realizaron ensayos de SEC analítica con columnas Superdex 75 (10-300) en buffer de almacenamiento, y el peso molecular fue estimado utilizando kits de calibración para alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) (Cytiva).

### **4.5.4. ANALISIS DE TERMOESTABILIDAD**

La termoestabilidad de las proteínas recombinantes se evaluó mediante fluorimetría diferencial de barrido en nanoescala (nanoDSF) en un Prometheus NT.48 (Nanotemper) y los valores de  $T_M$  para los procesos de desnaturalización y replegamiento se obtuvieron mediante calentamiento y enfriamiento secuenciales a velocidades controladas de 1°C/min entre 25-90 °C.

### **4.5.5. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)**

Los análisis de proteínas por dicroísmo circular se llevaron a cabo en un Chirascan V100 (Applied Photophysics) a 25 y 37°C. Para estudiar la estructura secundaria de las proteínas se realizaron medidas en la región del UV-lejano (FUV-CD por *Far-UV Circular Dichroism*) desde 185 hasta 260nm con cubetas de cuarzo de 1 mm de espesor. Para estudiar cambios a nivel de estructura terciaria se realizaron medidas en la región del UV-cercano (NUV-CD por *Near-UV Circular Dichroism*) desde 260 hasta 350nm con cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor. Para las medidas en el UV lejano las muestras fueron diluidas en agua deuterada al igual que el buffer para definir la línea de base. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software ProData Chirascan y la deconvolución de datos estructurales se llevó a cabo a través del servidor web BeStSel (Micsonai et al., 2018, 2021, 2022).

### 4.5.6. RESONANCIA PLASMONICA DE SUPERFICIE (SPR)

Los ensayos de SPR se realizaron en un Biacore 3000 (GE Healthcare) a 25°C y 37°C con un flujo de 10µL/min utilizando HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20) como buffer de corrida y un sensorchip CM5 (Cytiva) previamente recubierto con StrepTactin de Twin-Strep-tag® Capture Kit (IBA) según las recomendaciones del fabricante.

Se realizaron inyecciones de un minuto con 30 nM shACE2-ST para capturar entre 50-100 RU de proteína y tres inyecciones consecutivas de 10µL de GuHCl 3M al final de cada ciclo para regenerar la superficie. Los RBD<sup>clv</sup> (de distintas VOCs) se inyectaron a concentraciones variables (entre 0,75 nM y 96 nM) durante 3 minutos a un flujo de 10µL/min, seguido de una fase de disociación de 10 minutos. Los datos se referenciaron de manera doble (restando las señales de la superficie de referencia y de una inyección de buffer de corrida) y se ajustaron a un modelo cinético de interacción 1:1 (Langmuir) utilizando el software BIAevaluation versión 4.1.

### 4.5.7. ELISA

Para evaluar la interacción de los RBD<sup>clv</sup> de distintas VOCs (Wuhan, Delta y Omicron) inmovilizados en un soporte sólido con shACE2-ST en solución, se sensibilizaron placas NUNC Maxisorp (Thermo) con 2 µg/pocillo de RBD<sup>clv</sup> de diferentes variantes (dispensando 100 µL a 20 µg/mL diluido en PBS), las cuales se incubaron *overnight* a 4°C y se bloquearon con BSA 1% (w/v) en PBS. Luego de tres lavados con PBS adicionado con 0,5 % Tween20, se incubaron diferentes concentraciones de shACE2-ST (diluciones seriadas al triple desde 656,1 µg/mL hasta 0,1 µg/mL) a 25°C y 37°C por 1 hora. Finalmente se repitieron los lavados y se incubó por 1 hora con Streptactin-HRP (IBA) diluida 1:5000 en PBS.

Para comparar la estabilidad de los RBD-ST inmovilizados en un soporte sólido a distintas temperaturas, se utilizaron microplacas NUNC Maxisorp (Thermo), las cuales fueron sensibilizadas *overnight* a 4°C con los RBD-ST de las variantes Wuhan y Omicron a concentraciones crecientes desde 0,005 µg/mL hasta 80 µg/mL y se bloquearon con BSA 1% (w/v) en PBS. Luego de los lavados, se incubaron directamente con Streptactin-HRP (IBA) diluida 1:5000 en PBS.

Por su parte los ELISA de competición, se realizaron mediante sensibilización de microplacas NUNC Maxisorp (Thermo) con hACE2-Fc a 25 µg/mL (y BSA 1% como control) *overnight* a 4°C, en PBS. Las placas se lavaron con PBS 0,5% Tween y se bloquearon *overnight* a 4°C con buffer de bloqueo para ELISA (Immunochemistry Technologies). Los sueros humanos se diluyeron 1:10 y 1:100 en buffer estabilizante para conjugados HRP (Immunochemistry Technologies) y se preincubaron durante 30 minutos a

temperatura ambiente, con Streptactina-HRP (IBA) diluida 1:5000 y con los <sup>Wuhan</sup>RBD-ST u <sup>Omicron</sup>RBD-ST a una concentración final de 0,1µg/mL. Después de este período, los complejos se incorporaron a los pocillos con hACE2-Fc y se incubaron otros 30 minutos, para lavar y revelar.

Todos los ELISA fueron revelados con sustrato TMB (Sigma) durante 15 minutos y las reacciones colorimétricas fueron frenadas con 50 µL de ácido sulfúrico 11%. Las absorbancias a 450nm y 620nm se midieron en un lector de placas (Thermo) y los resultados se expresaron como la sustracción de las medidas realizadas a ambas longitudes de onda.

# CAPÍTULO 5: ANTICUERPOS BOVINOS CON CDRH3 ULTRA-LARGOS CAPACES DE BLOQUEAR LA INTERACCIÓN RBD:ACE2

## 5.1. INTRODUCCION

### 5.1.1. ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE AMPLIO ESPECTRO (bNAbs)

El uso de anticuerpos monoclonales con fines terapéuticos para en la infección por SARS-CoV-2 ha sido eficaz sobre todo en el tratamiento de individuos inmunocomprometidos (Saultier et al., 2022; Weinbergerová et al., 2022). Sin embargo, la aparición de nuevas variantes virales puso en evidencia la necesidad de contar con anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNAbs, por *broadly neutralizing antibodies*). En humanos, los bNAbs se generan tras sucesivas exposiciones al patógeno o a vacunas. En el caso de VIH, se sabe que la generación de bNAbs requiere múltiples exposiciones al virus, causadas por infecciones no progresivas (Pilgrim et al., 1997). Por su parte, en SARS-CoV-2 se ha visto que los sucesivos *boosters* de vacunas generan respuestas neutralizantes menos sensibles a las sustituciones de variantes como Omicron (Garcia-Beltran et al., 2022). Algunos anticuerpos neutralizantes del VIH han demostrado tener CDR3 muy extensos de hasta 38 aminoácidos de longitud (T. Zhou & Xu, 2018). Por otro lado, la inmunización de vacas con glicoproteínas de superficie de dicho virus ha generado respuestas de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro en forma acelerada (Sok et al., 2017), cuyo mecanismo de acción se basa en sus extensos CDR3 (cerca de 60 residuos de longitud) capaces de penetrar la estructura de glicanos que protege la superficie de la proteína y contactar con epítopes poco accesibles para anticuerpos clásicos (Stanfield et al., 2020).

### 5.1.2. ANTICUERPOS BOVINOS CON CDR3 DE CADENA PESADA ULTRA LARGOS (UL-CDRH3)

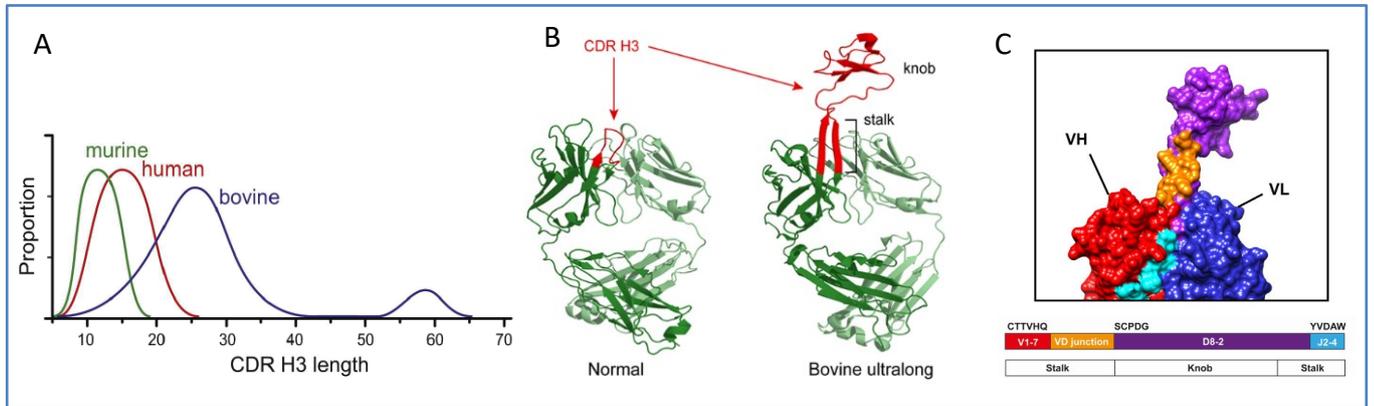
Se estima que una décima parte del repertorio de anticuerpos bovinos está conformado por inmunoglobulinas con dominios CDR3 excepcionalmente largas a nivel de cadena pesada (CDR3 por sus

siglas en inglés para *complementarity-determining region 3*). (**Figura 33.A**). Estos anticuerpos con UL-CDRH3 (por *ultra-long heavy chain CDR3*) fueron identificados por primera vez en vacas infectadas por el virus de la leucemia bovina (BLV), conteniendo dominios V<sub>H</sub> con CDR3 excepcionalmente largos y ricos en cisteínas. Estos CDR3 bovinos son originados de un re-arreglo particular de segmentos VDJ en la cadena pesada, al tiempo que los otros CDRs del dominio V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> no participan en la configuración paratópica ni en la generación de diversidad de la región variable del anticuerpo (Saini et al., 1999, 2003). En comparación con humanos y roedores, el repertorio de segmentos génicos V, D y J de bovinos es muy limitado y un mecanismo que se cree actúa en favor de aumentar la diversidad es la hipermutación somática que ocurre previo a la exposición con el antígeno en las placas de Peyer intestinales (Deiss et al., 2019; Liljavirta et al., 2013; Stanfield et al., 2018). Estructuralmente, estos CDR3 ultra largos presentan una conformación exclusiva que sobresale de la superficie del anticuerpo alrededor de 40Å, permitiéndole alcanzar epítopes poco accesibles a los anticuerpos convencionales (Deiss et al., 2019). Los UL-CDRH3 están conformados por un tallo o “stalk” en el que participan dos hebras β antiparalelas integradas por los aminoácidos de los extremos del CDR3, y la parte distal del CDR se encuentra coronada por una estructura compacta con forma de botón o “knob” responsable de la interacción con el antígeno (**Figura 33.B**). Dicho dominio “knob” es de pequeño tamaño y se encuentra estabilizado por numerosos puentes disulfuro que le confieren alta estabilidad y una conformación rígida (**Figura 33.C**) (Barroso et al., 2020; Haakenson et al., 2018).

Estos dominios “knob” son capaces de mantener su reconocimiento antigénico y capacidad neutralizante cuando son transferidos a anticuerpos humanos (Burke et al., 2020). Además, su plegamiento tridimensional manteniendo los extremos N- y C-terminales espacialmente cercanos, los convierte en buenos candidatos para ser producidos en forma aislada o fusionados a otras construcciones, sin perder capacidad de unión (Hawkins et al., 2022; Macpherson et al., 2020). Considerando su estructura sencilla, bajo peso molecular y gran estabilidad, este tipo de dominios se colocan al nivel de otras proteínas utilizadas como “binders” para unir antígenos específicos como nanobodies, afitinas, etc.

Si bien los anticuerpos con UL-CDRH3 fueron descubiertos a partir de vacas infectadas por BLV, la naturaleza del antígeno que los originó ha permanecido elusiva. Otros ejemplos de inmunizaciones de bovinos con el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) o el virus de la aftosa (FMDV) demuestran su importancia en modelos bovinos (K. Li et al., 2019; F. Wang et al., 2013). La capacidad neutralizante de los anticuerpos bovinos con UL-CDRH3 generados frente a la glicoproteína Env de VIH ha dejado claro su potencial frente a virus humanos (Sok et al., 2017), poniendo de manifiesto su utilidad para atacar patógenos emergentes (Burke et al., 2020). Más recientemente, se demostró la capacidad de los

anticuerpos bovinos con UL-CDRH3 de neutralizar diversas variantes de SARS-CoV-2, cuando son aislados de librerías naïve (Burke et al., 2022) o producto de la inmunización de vacas con la proteína spike de SARS-CoV-2 (R. Huang et al., 2023).



**Figura 33: Anticuerpos bovinos con CDR3 ultra-largos: A)** Representación del largo de los CDR3 de anticuerpos de diferentes especies **B)** Comparación de las estructuras de dos Fabs de anticuerpos con CDR3 normales y ultra largos. **C)** Detalle de la estructura del paratope de un anticuerpo con CDR3 ultra largos. Tomado de (Burke et al., 2022; Haakenson et al., 2018; F. Wang et al., 2013).

### 5.1.3. TERAPIAS DE INMUNIZACION PASIVA BASADAS EN VACAS HIPERINMUNES CONTRA SARS-CoV-2

Sobre todo al inicio de la pandemia de COVID-19, el uso compasivo de estrategias de inmunización pasiva (con plasma convaleciente y anticuerpos monoclonales) fue utilizado como alternativa terapéutica, a la que se sumaron otras estrategias (menos desarrolladas en términos de pruebas clínicas) como el uso de nanobodies obtenidos a partir de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (Huo et al., 2020; Q. Lu et al., 2021; Schoof et al., 2021) o sueros heterólogos hiperinmunes.

Históricamente los sueros hiperinmunes de equinos han sido utilizados para diversos fines y los coronavirus no han sido la excepción (da Costa et al., 2021). Diversos trabajos han demostrado la capacidad neutralizante de los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de suero equino hiperinmune contra SARS-CoV-2, que pueden ser administrados bajo la forma de F(ab')<sub>2</sub> (anticuerpos desprovistos de su dominio efector) (Palakurthi Biological Limited et al., 2020; Pan et al., 2020; Zylberman et al., 2020). En diciembre de 2020, Argentina aprobó el uso de suero equino hiperinmune (SHE) en pacientes adultos con COVID-19 moderado y grave mediante el registro de condiciones especiales (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, n.d.).

El uso de suero bovino hiperinmune tiene una historia mucho menos extensa en este sentido, siendo el consumo de leche enriquecida en anticuerpos, la estrategia de inmunización pasiva más promisorio frente a diversas patologías como alergias o infecciones virales (Ulfman et al., 2018). El consumo de leche de vacas inmunizadas con SARS-CoV-2 fue contemplado como alternativa, aunque no existen evidencias que

justifiquen su utilización (Jawhara, 2020). Sin embargo, su utilización en pacientes inmunocomprometidos podría ser también una alternativa sumamente accesible y con buenos resultados (Singh et al., 2023). Se han hecho experimentos con vacas transgénicas capaces de producir IgG tipo humanas contra MERS (Luke et al., 2016) y se han realizado pruebas clínicas de tolerabilidad y seguridad (Beigel et al., 2018).

## **5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 4**

Producir el ectodominio de la proteína S de SARS-CoV-2 en células S2 de *Drosophila* para inmunizar bovinos y aislar anticuerpos específicos con CDR3 ultra-largos, que puedan dar lugar a nuevas estrategias neutralizantes adaptadas a diversas variantes virales.

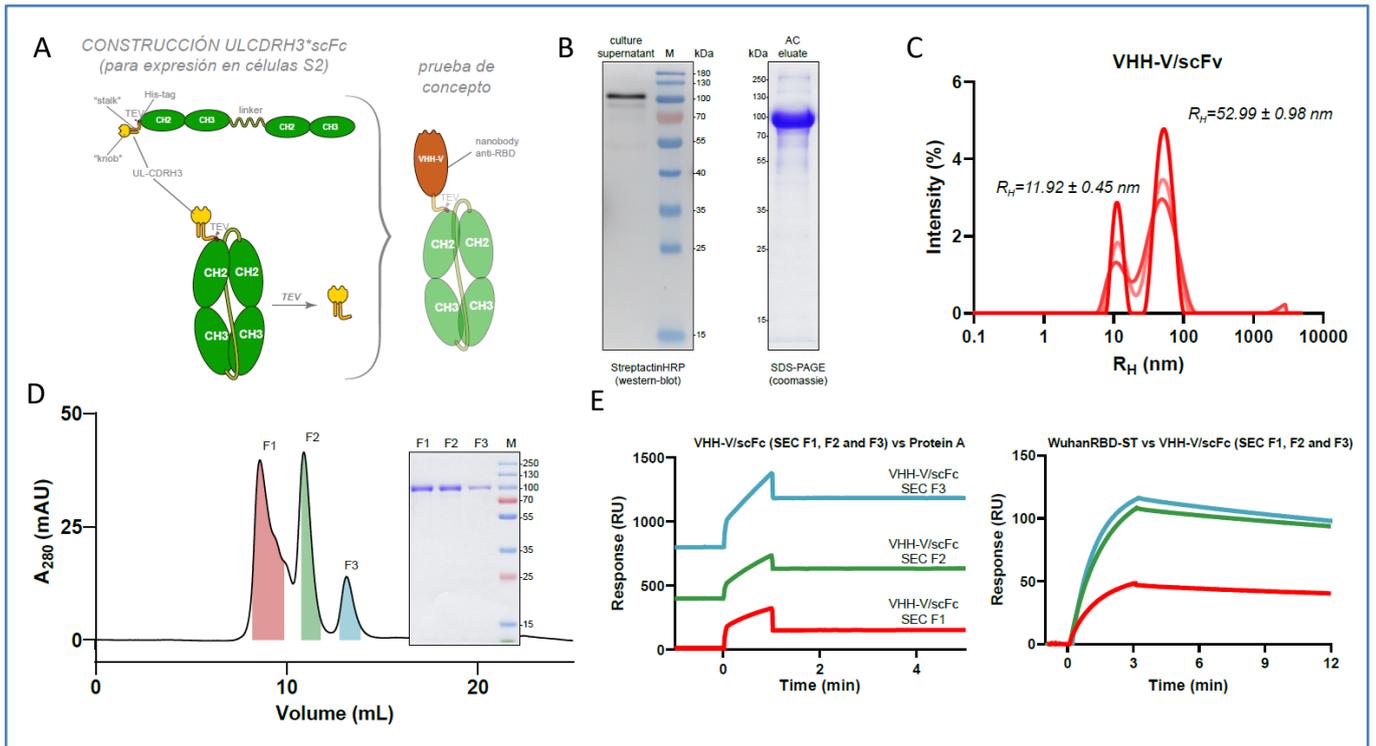
## 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1. PRODUCCIÓN DE UN NANOBODY ANTI-RBD FUSIONADO A scFc EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA

A diferencia de los nanobodies (originados de camélidos y tiburones), los UL-CDRH3 bovinos concentran su capacidad de unión en una región proteica de tamaño muy reducido pero no han podido ser expresados de forma aislada, requiriéndose el soporte o “*scaffold*” del resto del dominio variable (Stanfield et al., 2018). De manera general, los UL-CDRH3 se obtienen formando parte de anticuerpos completos o dominios como Fab, Fv e incluso fusionados a Fc. A pesar de representar una solución más alejada de lo que ocurre naturalmente, la fusión de UL-CDRH3 a dominios constantes (Fc) ha demostrado ser efectiva para obtener UL-CDRH3 y dominios *knobs* escindibles mediante tratamiento proteolítico (Macpherson et al., 2020), dando lugar a las primeras estructuras cristalográficas de dominios “knob” unidos a su proteína blanco (Macpherson et al., 2021). Además, el dominio Fc es ampliamente utilizado como *tag* de purificación, marcado y/o captura, e incluso puede ser explotado para favorecer respuestas citotóxicas mediadas por anticuerpos, abriendo un nuevo frente para los UL-CDRH3 bovinos (Yanakieva et al., 2023).

La estrategia inicialmente escogida para obtener dominios “*knob*” de anticuerpos bovinos específicos en células S2 de *Drosophila*, fue fusionarlos a un dominio Fc de inmunoglobulina humana en formato de cadena única (scFc, por *single chain Fc*) de acuerdo con MacPherson y colaboradores (Macpherson et al., 2020). Un scFc es una cadena polipeptídica compuesta por dos pares de dominios constantes de IgG (CH2 y CH3) dispuestos en tándem y separados por un *linker* flexible que permite su emparejamiento emulando un dímero de cadenas pesadas de IgG similar al dominio cristizable de anticuerpos. Si bien dicha construcción carece de dominios variables, estos autores utilizaron células de mamífero para expresar CDR3 ultra-largos fusionados a scFc, con un sitio de corte para la proteasa de TEV que permite obtenerlos en forma aislada sin perder la capacidad de reconocimiento antigénico.

En nuestro trabajo, decidimos utilizar el sistema de expresión en S2 para producir dominios scFc que actúen como scaffold para presentar UL-CDRH3 bovinos. Para ello, se sintetizó un gen con la secuencia de un scFc precedido de un nanobody específico contra RBD de SARS-CoV-2 como dominio de prueba que nos permitiera realizar ensayos de expresión y reconocimiento antigénico. El nanobody utilizado a tal efecto fue el VHH-V capaz de unirse a <sup>Wuhan</sup>RBD con alta afinidad, mostrando una disociación sumamente lenta y actividad neutralizante (Koenig et al., 2021) (**Figura 34.A**).



**Figura 34: Producción de VHH-V/scFc en células de S2 de *Drosophila*.** **A)** Esquema de construcciones para producir dominios de anticuerpos (UL-CDRH3 a la derecha y nanobodies a la izquierda) ligados a scFc. **B)** Análisis por western blot con Streptactina conjugada a HRP del sobrenadante de cultivo inducido por 24 horas y por SDS-PAGE teñido con Coomassie del VHH-V/scFc purificado por cromatografía de afinidad. **C)** Distribución de tamaños analizados por intensidad de DLS para el eluato de la cromatografía de afinidad concentrado. Se presentan las distribuciones de tres replicas (en diferentes tonalidades de rojo) y los radios hidrodinámicos calculados como el promedio de las medias de cada población, seguidos de la desviación estándar. **D)** Análisis por SEC preparativa en una Superdex 200 (10-300) del VHH-V/scFc purificado por cromatografía de afinidad. Se obtuvieron múltiples picos con diferentes volúmenes de exclusión, colectándose tres fracciones que se señalan con el área bajo la curva en rojo (F1), verde (F2) y azul (F3). **E)** Captura de las tres fracciones de SEC semipreparativa (F1, F2 y F3) en un chip de Proteína A (izquierda) y resultado de la inyección simultánea de <sup>Wu</sup>hanRBD-ST (13  $\mu$ g/mL) sobre las tres superficies (derecha). Tras sucesivos ciclos de captura, las densidades finales de VHH-V/scFc capturado fueron de 188 RU (F1), 397 RU (F2) y 385 RU (F3), obteniéndose respuestas de binding por <sup>Wu</sup>hanRBD-ST proporcionales a los niveles capturados y con pendientes de disociación relativamente similares.

Al igual que con las demás construcciones utilizadas en este trabajo, se incluyó un *Strep-tag* en el extremo C-terminal del VHH-V/scFc, que permitió su detección por *western blot* a las 24 h post inducción y su purificación por cromatografía de afinidad luego de 4 días de inducción, dando lugar a una proteína pura con un peso de aproximadamente 100 kDa (**Figura 34.B**). Este resultado fue inesperado teniendo en cuenta que el tamaño estimado a partir de la secuencia primaria de la construcción es de 76,7 kDa y que la N-glicosilación de dominios Fc de anticuerpos es escasa, con un único sitio de N-glicosilación en la asparagina 297 de cada dominio CH2 (Kiyoshi et al., 2017). Además, tal como hemos descrito en el capítulo 2 de este trabajo y en trabajos anteriores (Tomé-Poderti et al., 2024), el patrón de N-glicosilación de las proteínas recombinantes producidas en células S2 suele coincidir con glicanos pauci-manosídicos y ricos en manosa de menor complejidad que en mamíferos. Por tanto, es de esperar que el VHH-V/scFc producido en S2 posea PTMs adicionales o que exista alguna modificación no deseada en la secuencia génica, que redunde en la producción de una proteína de mayor tamaño. En este sentido, es necesario re-

secuenciar el gen sintetizado, llevar a cabo ensayos de deglicosilación y comprobar la cobertura de secuencia por espectroscopía de masas con el propósito de explicar el mayor tamaño de la proteína obtenida.

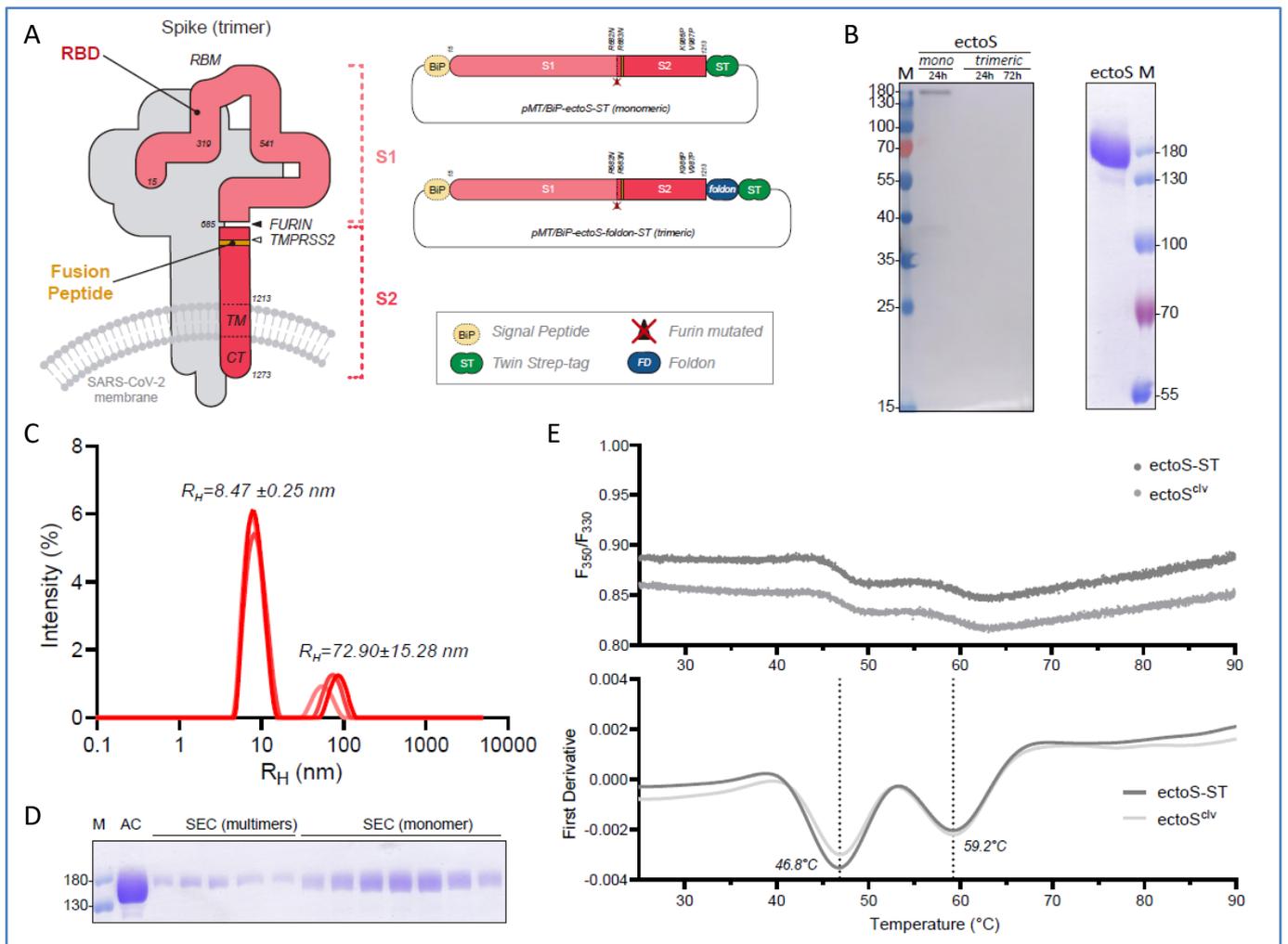
Una vez purificado, el VHH-V/scFc fue concentrado y analizado por DLS dando lugar a una población mayoritaria con radio hidrodinámico de  $11,92 \pm 0,45$  nm y una población secundaria de  $52,99 \pm 0,98$  nm, lo cual sugiere la presencia de agregados moleculares (**Figura 34.C**). Al ser purificado por SEC semipreparativa, el VHH-V/scFc fue eluido en múltiples volúmenes de exclusión: aproximadamente el 50% de la muestra se obtiene como una fracción de alto peso molecular (F1), seguido de una fracción de aproximadamente 300 kDa (F2) y un pico minoritario correspondiente al monómero de 106 kDa (F3) (**Figura 34.D**). Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE dando lugar a bandas de aproximadamente 100 kDa, y cuando las mismas fueron inyectadas en chips de SPR recubiertos de proteína A, se observó que las tres fracciones fueron capturadas con constantes cinéticas de disociación muy lentas (tal como se espera para proteínas conteniendo dominios Fc). Además, subsiguientes inyecciones de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST mostraron una señal de unión específica y proporcional a los niveles de VHHV/scFc capturados vía Fc (**Figura 34.E**).

De esta manera, demostramos que la proteína expresada en células S2 se obtiene en forma soluble y es capaz de conservar sus propiedades de unión con Proteína A a través del Fc y con el RBD de SARS-CoV-2 vía VHH-V. En función de esto, creemos que estos scFc pueden ser un *scaffold* estructural promisorio para clonar y expresar UL-CDRH3 específicos en células de insecto, a pesar de la polidispersión evidenciada. Además, el dominio Fc representa una herramienta de enorme versatilidad como marcador específico o como mediador de respuestas efectoras, abriendo múltiples posibilidades. En este sentido, las modificaciones postraduccionales propias del sistema de expresión deben ser estudiadas en detalle, sobre todo si tenemos en cuenta las características particulares de la glicosilación en células de insecto y el efecto de estas en la funcionalidad de los dominios Fc (Kiyoshi et al., 2017; T. T. Wang, 2019).

### 5.3.2. PRODUCCIÓN DEL ECTODOMINIO DE SPIKE EN CÉLULAS S2 DE DROSOPHILA

El ectodominio de la proteína Spike de SARS-CoV-2 (ectoS) fusionado a un doble *Strep-tag* se obtuvo siguiendo la estrategia utilizada anteriormente por nuestro grupo para producir el ectodominio de la glicoproteína Env del virus de la leucemia bovina (VLB): mutamos el sitio de corte por proteasas celulares de tipo furina para generar un mutante defectivo a la proteólisis que conserve todos los epitopes proteicos (Tomé-Poderti et al., 2024). De acuerdo con esto, sustituimos los residuos arginina en las posiciones 682-683 (pertenecientes al sitio de corte con furina de Spike) por residuos asparagina y removimos la secuencia

codificante del segmento transmembrana y endodominio de la subunidad S2 de Spike (residuos 1214-1273) con el objetivo de obtener una versión soluble conteniendo ambas subunidades S1 y S2. Además, con el objetivo de estabilizar el estado pre-fusión de Spike, sustituimos por prolina los residuos K986 y V987 de acuerdo con Amanat y colaboradores, quienes también expresaron el ectodominio de Spike en células de insecto (Amanat et al., 2020). De acuerdo con estos autores, se diseñó también una construcción trimérica insertando la secuencia codificante del dominio de trimerización de fibritina del bacteriófago T4 (*foldon*) entre el extremo C-terminal de ectoS (después del residuo 1213) y el *tag* de purificación (Figura 35.A). Cabe destacar que al momento de generar nuestras construcciones, la sustitución D614G (que se estableció rápidamente en todas las variantes emergentes) no había sido descrita aún, y por tal motivo no fue incluida en nuestros plásmidos de expresión.



**Figura 35: Producción del ectodominio de la Spike de SARS-CoV-2 (ectoS) en células S2 de *Drosophila*.** **A)** Esquema de las construcciones diseñadas para producir versiones de ectoS monomérica y trimérica. **B)** Análisis por western blot con Streptactina conjugada a HRP del sobrenadante de cultivo inducido por 24 y 72 horas para expresar ectoS y análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie del ectoS monomérico purificado por cromatografía de afinidad. **C)** Distribución de tamaños de ectoS analizados por intensidad de DLS para el eluato de la cromatografía de afinidad. Se presentan las distribuciones de tres replicas (en diferentes tonalidades de rojo) y los radios hidrodinámicos calculados como el promedio de las medias de cada población, seguidos de la desviación estándar. **D)** SDS-PAGE no reductor de la ectoS-ST purificada por cromatografía de afinidad (AC) y múltiples fracciones de SEC correspondientes a multímeros y monómeros. **E)** Análisis de termoestabilidad por nanoDSF

con las versiones de ectoS previo a la remoción proteolítica del tag y después del tratamiento con enteroquinasa (ectoS-ST y ectoS<sup>clv</sup>, respectivamente). Las curvas de fluorescencia se presentan en función de la temperatura (*arriba*) acompañado de su primera derivada (*abajo*) junto con los valores de T<sub>m</sub> calculados a partir de las transiciones térmicas correspondientes.

La proteína monomérica fue detectada por *western blot* en el sobrenadante de cultivo a las 24 horas post inducción, no obstante la proteína trimérica no pudo ser detectada incluso luego de 3 días, sugiriendo que su expresión soluble en el sobrenadante de cultivo se ve comprometida (**Figura 35.B**). De este modo, se decidió continuar con la versión monomérica de ectoS, obteniendo una proteína purificada por cromatografía de afinidad que en SDS-PAGE (en condiciones reductoras) migra como una banda única con un peso molecular de aproximadamente 180 KDa (**Figura 35.B**). Este resultado demuestra que las sustituciones en el sitio de corte por furina (presentes en las células S2) fueron efectivas para impedir su procesamiento y dar lugar a una proteína completa que mantiene ambas subunidades S1 y S2.

En cuanto a los rendimientos de producción, los mismos se evaluaron con diversos lotes obtenidos a partir de escalas variables entre 160mL y 1L de cultivo, mostrando valores entre 2 y 9 mg L<sup>-1</sup>.

El ectodominio de Spike ha sido producido en células de insecto con rendimientos modestos a moderados. Amanat y colaboradores utilizaron una construcción similar a la que diseñamos aquí para expresar el ectodominio de Spike trimérico en el sistema de baculovirus, con rendimientos de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Por su parte, Struble y colaboradores (Struble et al., 2022) utilizaron células de *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* para expresar el ectodominio de spike monomérico con rendimientos de 0,2 mg L<sup>-1</sup> y el ectodominio trimérico con rendimientos entre 1,2 y 4,4 mg L<sup>-1</sup>. Cabe destacar que la construcción utilizada por estos autores fue estabilizada con múltiples sustituciones por prolinas de acuerdo con Hsieh y colaboradores (Hsieh et al., 2020). Esta versión de Spike identificada como HexaPro posee seis sustituciones por prolinas que estabilizan la conformación prefusión de Spike. La versión HexaPro de Spike ha sido ampliamente utilizada y podría ser un gran insumo para producir una versión trimérica de ectoS en células S2. Asimismo, la introducción de residuos adicionales entre el extremo C-terminal de ectoS y el dominio foldon podría favorecer la formación de contactos moleculares entre las interfaces de trimerización de ectoS y dicho dominio, beneficiando su conformación trimérica.

El peso molecular estimado a partir de la secuencia primaria de ectoS fusionada a *Strep-tag* es de 139 KDa, sin embargo el tamaño esperado debería ser superior por tratarse de una proteína altamente glicosilada. El ectodominio de Spike producido en células de mamífero posee 23 sitios de N-glicosilación con alta ocupancia (Gong et al., 2021). Si tenemos en cuenta el peso molecular y la frecuencia de aparición de los glicanos identificados en proteínas producidas en S2, como el RBD de SARS-CoV-2 (capítulo 2) o el ectodominio de la glicoproteína Env de BLV (Tomé-Poderti et al., 2024), esperaríamos obtener un incremento de peso molecular cercano al 20%, que se aproxima al observado por SDS-PAGE. El análisis de

tamaños de ectoS por DLS revela la presencia de una población mayoritaria con radio hidrodinámico de  $8,47 \pm 0,25$  nm, acompañada de una población minoritaria con radio hidrodinámico de  $72,9 \pm 15,28$  nm (**Figura 35.C**). La distribución polidispersa de la población principal sugiere que podría incluir varios estados de oligomerización discretos o tratarse de proteínas con un plegamiento poco compacto que aumenta su radio hidrodinámico. La ectoS fue purificada por SEC semipreparativa utilizando una columna Superdex 200 (10-300), obteniéndose un pico minoritario correspondiente a multímeros que eluye en un volumen de exclusión de 8,76 mL, seguido de un pico principal correspondiente al monómero que eluye a los 10,69 mL (no mostrado). Todos los picos de SEC mantuvieron su volumen de exclusión cuando fueron re-inyectados en las mismas condiciones, demostrando que las distintas especies oligoméricas no se encuentran en equilibrio. Además, cuando dichas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, se evidenciaron bandas con igual migración electroforética, sugiriendo que se trata de la misma proteína y que dichos multímeros no se encuentran estabilizados por enlaces disulfuro (**Figura 35.D**). Por tales motivos, se decidió utilizar el total de la proteína purificada por cromatografía de afinidad para inmunizar vacas, introduciendo un paso extra de remoción del *Strep-tag*, de manera similar que con RBD y shACE2 (capítulo 2). La ectoS fue incubada durante 16 horas con enteroquinasa bovina (200 U por mg de ectoS), dializada y reinyectada en un segundo paso de cromatografía de afinidad para colectar la proteína clivada (ectoS<sup>clv</sup>) en la fracción no unida. El análisis de termoestabilidad por nanoDSF con las proteínas ectoS-ST y ectoS<sup>clv</sup> muestra transiciones hacia el azul (transiciones con valores negativos en la primera derivada), con dos transiciones bien definidas ( $T_m$  de  $46,8^\circ\text{C}$  y  $59,2^\circ\text{C}$ ), coincidiendo con los resultados reportados para construcciones similares (Hsieh et al., 2020; Williams et al., 2023) (**Figura 35.D**).

### 5.3.3. INMUNIZACIÓN DE VACAS CON EL ECTODOMINIO DE SPIKE Y ANÁLISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL.

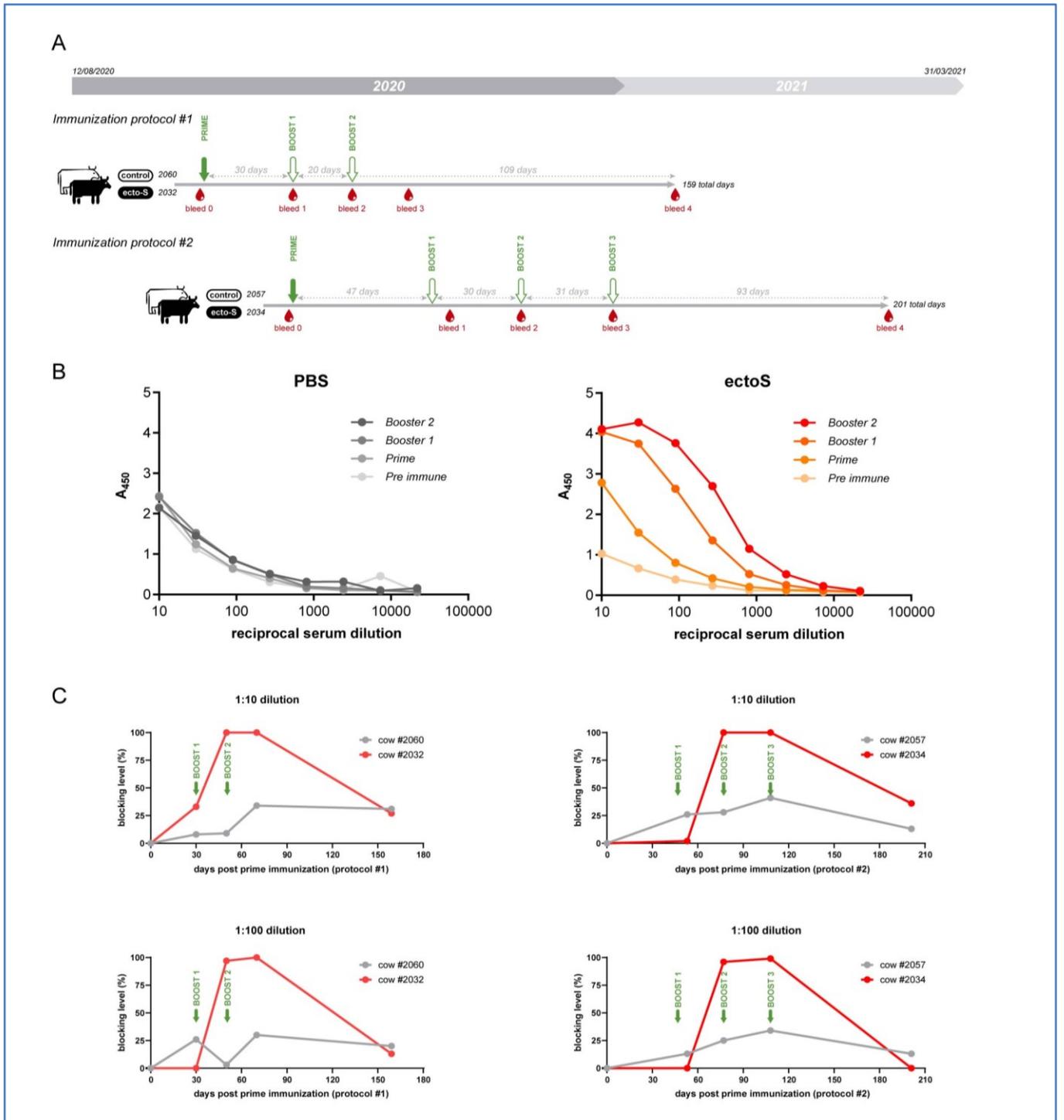
La proteína ectoS<sup>clv</sup> fue alicuotada a  $78 \mu\text{g/mL}$ , esterilizada por filtración y emulsionada con adyuvante previo a cada inmunización. Estas se realizaron de acuerdo con dos protocolos diferentes (protocolos #1 y #2), utilizando la misma cantidad de proteína y condiciones de inmunización ( $350 \mu\text{g}$  de ectoS<sup>clv</sup> en 5 mL de Luminigel 10% en PBS), con diferente número de *boosters* y días de separación entre estos (**Figura 36.A**).

Los títulos de IgG de animales inmunizados con el adyuvante (control) y con ectoS, se analizaron con un ELISA basado en el antígeno <sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup> que fue optimizado y adaptado para detectar anticuerpos bovinos. A diferencia del grupo control, los niveles de IgG específicas contra RBD fueron aumentando con los

sucesivos *boosters*, demostrando que la inmunización con ectoS fue efectiva a pesar de no haber sido estabilizada en su forma trimérica (**Figura 36.B**).

Teniendo en cuenta que los ensayos alternativos de neutralización de SARS-CoV-2 desarrollados en el capítulo anterior no presentan especificidad de especie, decidimos utilizarlos para evaluar la capacidad de los sueros bovinos para bloquear la interacción de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST con el receptor ACE2 (**Figura 36.C**). Los resultados obtenidos demuestran que el test desarrollado en el capítulo anterior es efectivo para evidenciar la capacidad de competición de sueros de origen bovino y demostrar que las inmunizaciones con ectoS permitieron generar una respuesta de anticuerpos capaz de bloquear la interacción *in vitro* entre <sup>Wuhan</sup>RBD:ACE2, con niveles similares a los observados con sueros humanos tras la administración de la tercera dosis de vacunas heterólogas. Aunque los niveles de seroconversión frente a RBD y la capacidad de bloquear la interacción con el receptor ACE2 son promisorios, nuestro análisis no pretende establecer una comparación entre las vacunas administradas en humanos y nuestra formulación con ectoS para inmunizar vacas, sino demostrar que los anticuerpos generados en vacas son específicos y capaces de bloquear dicha interacción. De manera complementaria, el análisis alternativo de neutralización demuestra que, independientemente del protocolo de inmunización aplicado, dicha capacidad bloqueante es drásticamente disminuida después de tres meses de la administración del último *booster*, al igual que ocurre con las vacunas administradas en humanos.

Dado que se obtuvieron PBMCs de cada extracción con el propósito de seleccionar células B específicas para conformar una librería de genes de anticuerpos que incluyeran UL-CDRH3, los resultados de seroconversión y neutralización alternativa son de gran utilidad para definir cuáles colecciones de PBMCs utilizar para confeccionar dichas librerías.



**Figura 36: Inmunización de vacas con el ectodominio monomérico de la Spike de SARS-CoV-2 (ectoS) y análisis de respuesta. A)** Esquema de las inmunizaciones realizadas de acuerdo con los protocolos #1 y #2. En cada protocolo se utilizaron dos vacas inmunizadas con ectoS y con adyuvante (control), respectivamente. Las inmunizaciones primarias y boosters se representan con flechas verticales de color verde (con los días que separan cada inmunización señalizados con flechas horizontales discontinuas). Los sangrados para obtener suero y PBMCs se representan en rojo (numerados de 0 a 4). **B)** ELISA de titulación (con <sup>Wuhan</sup>RBD como antígeno) a partir de muestras de suero de vacas sometidas al protocolo de inmunización #1. A la izquierda se presentan los resultados obtenidos con la vaca control (#2060) y a la derecha se presentan los resultados correspondientes a la vaca inmunizada con ectoS (#2032). **C)** Ensayos alternativos de neutralización (sVNTs) utilizando sueros de vacas inmunizadas de acuerdo con el protocolo #1 (izquierda) y #2 (derecha). Los resultados se obtuvieron aplicando el ensayo desarrollado en el capítulo 4, utilizando <sup>Wuhan</sup>RBD-ST (1.7nM) en presencia de Streptactina-HRP (1:5000) y diluciones de suero 1:10 (arriba) y 1:100 (abajo). Todas las absorbancias fueron restadas con un blanco medido a partir de la absorbancia en presencia de Streptactin-HRP 1:5000 (sin RBD) correspondiendo al 100% de bloqueo. En el eje de abscisas se presentan los días transcurridos desde el inicio de la inmunización, y los boosters se indican mediante flechas de color verde.

### 5.3.4. PRUEBA DE CONCEPTO: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN DOMINIO DE ANTICUERPO CON UL-CDRH3 EN CÉLULAS S2

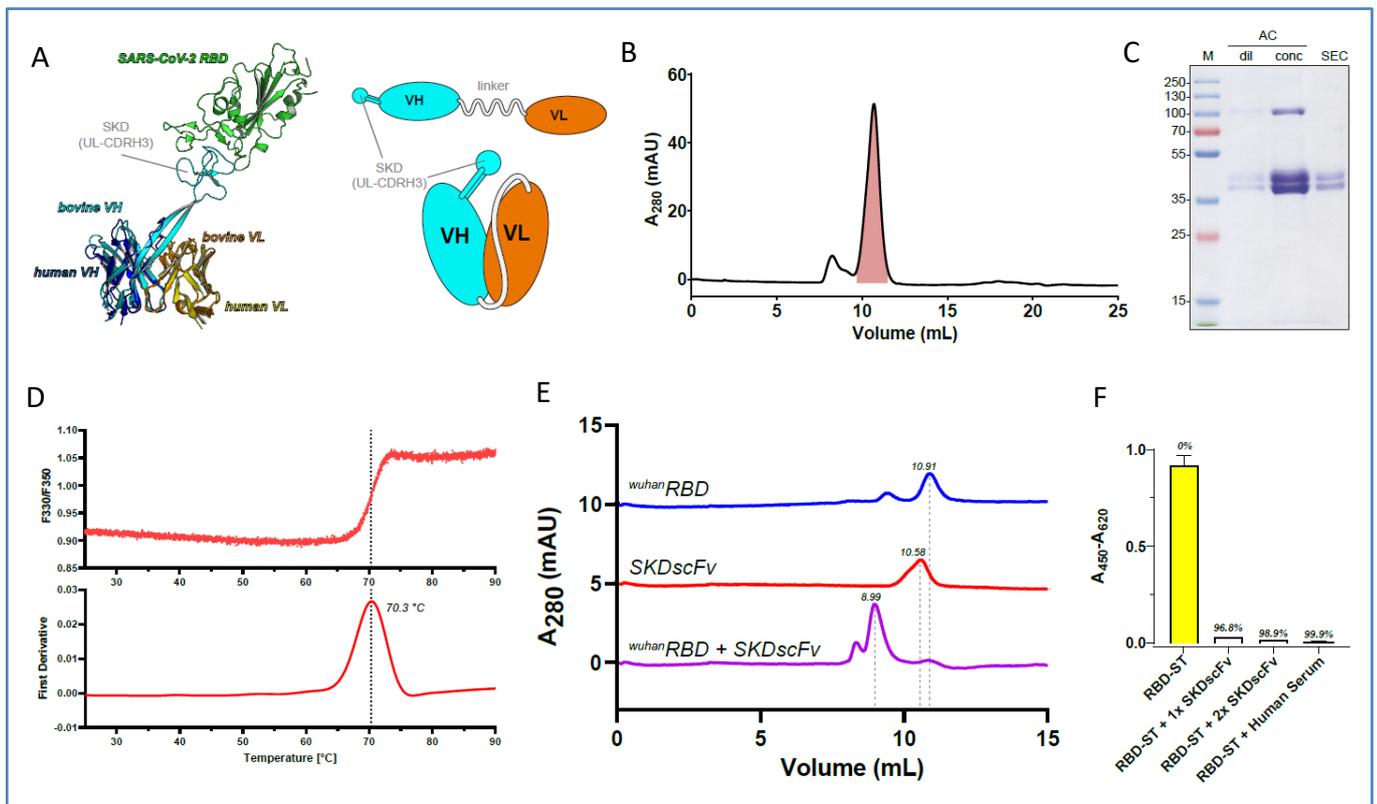
Un trabajo publicado a finales de 2023 presenta la inmunización de vacas con la proteína Spike de SARS-CoV-2 y la obtención de anticuerpos bovinos con CDR3 de cadena pesada ultra-largos, caracterizando numerosos clones que fueron producidos en células de mamífero como dominios Fab (R. Huang et al., 2023). Estos autores, además de caracterizar la interacción con Spike y demostrar su capacidad de neutralización frente a diversas variantes de SARS-CoV-2, fueron capaces de resolver las estructuras de diversos dominios Fab con UL-CDRH3 por cristalografía de rayos X. En particular, obtuvieron el complejo cristalográfico de un clon (identificado como SKD) unido al <sup>Wuhan</sup>RBD de SARS-CoV-2, resolviendo su estructura a una resolución de 3,4 Å, convirtiéndose junto con los UL-CDRH3 específicos contra la Env de VIH (Stanfield et al., 2020), en las únicas estructuras de complejos de UL-CDRH3s y su antígeno reportadas hasta el momento.

Dicha obtención de anticuerpos bovinos con CDR3 ultra-largos a partir de vacas inmunizadas con Spike representó un revés a la originalidad de nuestro trabajo. Sin embargo, y a pesar de las diferencias, el trabajo de Huang y colaboradores va en línea con la factibilidad de obtener anticuerpos bovinos con UL-CDRH3 a partir de las colecciones de PBMCs de vacas inmunizadas (tal como se describió en la sección anterior). La demostración de que los anticuerpos aislados de vacas son capaces de reaccionar de manera cruzada con diferentes variantes virales de SARS-CoV-2 (a pesar de haber sido generados contra la variante ancestral) apoya nuestra hipótesis de generar anticuerpos bovinos con una capacidad neutralizante amplia en base a esta estrategia. Incluso, la resolución de la estructura del complejo con su antígeno demuestra que la superficie de interacción depende exclusivamente del dominio *knob* (alejado del resto del anticuerpo) y que dicho clon es capaz de unirse al RBM en las conformaciones “up” y “down” de RBD, apoyando nuestra hipótesis de generar anticuerpos bovinos capaces de interactuar con epítopes poco accesibles de SARS-CoV-2, como los que se encuentran en la glicoproteína de superficie del virus.

En base a estos resultados, decidimos demostrar la factibilidad de producir un UL-CDRH3 específico contra SARS-CoV-2 en células S2 de *Drosophila*. Dado que el comportamiento en solución del scFc fusionado a un nanobody presentó algunas dificultades (sección 5.3.1), decidimos expresar el clon SKD (R. Huang et al., 2023) en el contexto del propio V<sub>H</sub> bovino. Para ello, diseñamos la construcción de un scFv conteniendo los dominios V<sub>H</sub> (con la secuencia SKD) y V<sub>L</sub> de origen bovino, unidos por un *linker* flexible optimizado para expresión de scFv en células S2 de *Drosophila* (Gilmartin et al., 2012).

En primer lugar hicimos un alineamiento tridimensional utilizando la estructura del Fab-SKD (de origen bovino) unido a RBD (PDB: 8EDF) y la estructura de un scFv (de origen humano) producido en células S2

de *Drosophila* (PDB: 3U6R). El alineamiento se realizó en base a los dominios variables de las cadenas livianas ( $V_L$ ), y como era de esperar se obtuvo un alto nivel de emparejamiento estructural a nivel de estos dominios (a pesar de provenir de especies diferentes). El nivel de alineamiento de los dominios  $V_H$  fue menor pero igualmente alto, con la base de los CDR3 ubicados en la misma posición, a pesar de las grandes diferencias en su secuencia (y de los dominios  $C_{H1}$  y  $C_L$  de los Fab que podrían estar imponiendo algún tipo de restricción tridimensional a los dominios variables). Este escenario nos alentó a sintetizar los genes correspondientes para producir un SKDscFv expresado en células S2, de acuerdo con la estrategia previamente reportada (Gilmartin et al., 2012) (**Figura 37.A**).



**Figura 37: Producción y caracterización de un scFv con UL-CDR3 específico en células S2. A)** Diseño de una construcción para producir un scFv con dominios variables de origen bovino y un CDR3 ultra-largo con especificidad por RBD de SARS-CoV-2. A la izquierda se presenta el alineamiento estructural (basado en los  $V_L$ ) de un Fab bovino producido en células de mamífero, con un CDR3 ultra-largo (SKD) formando complejo con el RBD de SARS-CoV-2 (PDB ID: 8EDF) y un scFv humano producido en células S2 de *Drosophila* (PDB ID: 3U6R). Para el complejo del Fab bovino y su antígeno se presentan el RBD (verde) y solo los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$  en cian y anaranjado, respectivamente. El scFv se presenta con sus dominios  $V_H$  y  $V_L$  en azul y amarillo, respectivamente. A la derecha se presenta un esquema de la construcción diseñada para producir en células S2 los dominios variables bovinos en formato SKDscFv. **B)** SEC semipreparativa realizada en una Superdex 75 (10-300) para purificar el SKDscFv. El pico principal correspondiente al monómero eluye a los 10.7 mL y la fracción colectada se muestra con el área bajo la curva coloreado en rojo. **C)** SDS-PAGE reductor de las fracciones purificadas. El eluato de la cromatografía de afinidad (AC) se cargó antes (dil) y después de ser concentrado (conc) para su re-purificación por SEC. **D)** Análisis de la termoestabilidad del SKDscFv por nanoDSF. Las curvas de fluorescencia se presentan en función de la temperatura (*arriba*) acompañado de su primera derivada (*abajo*) con el valor de  $T_m$  calculado a partir de la transición térmica (70.3°C). **E)** Análisis de la interacción específica entre los dominios RBD y scFV por SEC analítica en una Superdex 75 (10-300). Los dominios RBD y scFV fueron inyectados a 1.6  $\mu$ M en forma individual (cromatogramas azul y rojo) o en forma conjunta (cromatograma violeta) y los volúmenes de exclusión se presentan junto a cada pico principal. **F)** Análisis de neutralización alternativa utilizando el sVNT desarrollado en el capítulo 4. Los experimentos se llevaron a cabo con <sup>Wuhan</sup>RBD-ST (1.7 nM) y Streptactin-HRP (1:5000) para definir el 0% de neutralización. Para las pruebas de bloqueo se utilizó SKDscFv 1.7nM (1x) y 3.4nM (2x) además de un control con una dilución 1:100 de suero

humano proveniente de un individuo vacunado con tres dosis de vacunas heterólogas que mostró altos niveles de anticuerpos específicos y neutralización. Todas las absorbancias fueron restadas con un blanco medido a partir de la absorbancia en presencia de Streptactin-HRP 1:5000 (sin RBD) correspondiendo al 100% de bloqueo.

La estrategia de expresión y purificación utilizada fue la misma que aplicamos a lo largo de esta tesis, obteniéndose un eluato de cromatografía de afinidad que al ser inyectado en una SEC semipreparativa dio lugar a un pico principal eluido a los 10,7 mL, precedido de un pico minoritario de mayor tamaño (**Figura 37.B**). El análisis por SDS-PAGE de la proteína purificada por afinidad muestra una banda totalmente inesperada de 100 KDa (tal como vimos con el VHH-V/scFc en la sección 5.3.1) (**Figura 37.C**). Dado que la purificación de plásmidos y los sucesivos pasos para obtener líneas estables se realizaron en paralelo, es probable que se trate de una contaminación cruzada. De todos modos, la diferencia de peso molecular entre ambas permite su separación por tamaños, obteniéndose una proteína pura después de la SEC semipreparativa. Tanto el eluato de la cromatografía de afinidad como el de la SEC mostraron una doble banda con tamaños cercanos a los 40 KDa en SDS-PAGE reductor que coincide con cierto grado de asimetría en el pico principal de la SEC, sugiriendo la existencia de heterogeneidad.

La termoestabilidad del SKDscFv purificado por SEC fue analizada por nanoDSF mostrando una elevada  $T_M$  de 70,3°C (**Figura 37.D**). Este valor de  $T_M$  resulta similar al obtenido con el Fab bovino desarrollado contra la Env del HIV (Sok et al., 2017; Svilenov et al., 2021) y es cercano al valor de  $T_M$  alcanzado en construcciones de tipo scFv “clásicos” que fueron especialmente ingenierizadas para aumentar su estabilidad térmica (Boucher et al., 2023). La elevada estabilidad en solución es una cualidad que podría ser explotada en un futuro a través de diversas aplicaciones biotecnológicas que utilizan este tipo de scFv con UL-CDRH3s producidos en células S2.

Para evaluar la funcionalidad de nuestro SKDscFv llevamos a cabo experimentos de SEC analítica haciendo inyecciones independientes de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST y SKDscFv a concentraciones de 1,6  $\mu$ M, con volúmenes de exclusión a 10,91 mL (correspondiente a una proteína de 40,2 KDa) y a 10,58 mL (correspondiente a una proteína de 45,5 KDa). Cuando ambas proteínas fueron co-inyectadas a la misma concentración, los volúmenes de exclusión se vieron alterados, mostrando un volumen de elución de 8,99 mL (en correspondencia con una proteína de 80,74 KDa) y presentando un aumento en la absorbancia total como resultado de la co-elución de ambas proteínas (**Figura 37.E**). Aunque preliminares, estos resultados demuestran que el SKDscFv es capaz de unirse a <sup>Wuhan</sup>RBD con alta afinidad en concordancia con los valores sub-nanomolares previamente reportados (R. Huang et al., 2023).

Al igual que con los sueros de vacas inmunizadas, utilizamos los ensayos alternativos de neutralización desarrollados en el capítulo anterior para evaluar la capacidad bloqueante del SKDscFv. Como control se utilizó un suero humano proveniente de un individuo vacunado con tres dosis de vacunas heterólogas y

que muestra alta capacidad neutralizante cuando es diluido 1:100 (99,9%). Los niveles de bloqueo logrados con el SKDscFv fueron muy promisorios, alcanzándose un valor de bloqueo de 96,8% cuando fue usado a una relación equimolar respecto de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST y de 98,9% cuando se utilizó el doble (**Figura 37.F**).

De este modo, demostramos que el sistema de expresión en S2 es una muy buena alternativa para expresar scFvs con CDR3 ultra-largos. Considerando el rápido y fácil crecimiento de las células S2, los scFv podrían fusionarse con dominios transmembrana y ser expresados en la superficie de células S2, adaptándolos como técnica de “*cell display*”, que sirva de alternativa a otras estrategias basadas en fagos y levaduras (Arras et al., 2023; Joyce et al., 2023).

## 5.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo demuestra la idoneidad del sistema de expresión en células S2 para producir una versión soluble de la proteína Spike de SARS-CoV-2 en el sobrenadante de cultivo, previniendo su procesamiento proteolítico y manteniendo todos los determinantes antigénicos del ectodominio.

A pesar de no incluir modificaciones para estabilizar los trímeros en su conformación prefusión, la solubilidad y termoestabilidad alcanzada fue acorde con la bibliografía, obteniéndose rendimientos de producción aceptables y suficientes para llevar a cabo las inmunizaciones de vacas.

En este sentido, la proteína demostró ser inmunogénica detectándose IgGs específicas contra RBD, con niveles crecientes en función de los *boosters* administrados. Además, se observó una capacidad de neutralización (evaluada con ensayos alternativos) que se asemeja a la lograda en humanos con tres dosis de vacunas heterólogas y que evidencia una drástica caída luego de tres meses de finalizadas las inmunizaciones.

Por otro lado, este sistema de expresión en S2 resultó ser apto para producir dominios de anticuerpos como scFc y scFv, los cuales pueden servir de *"scaffold"* para tolerar UL-CDRH3 bovinos funcionales. Las pruebas de concepto realizadas en este capítulo demostraron que los mismos son solubles, estables y capaces de interactuar con el antígeno RBD.

La capacidad de neutralización de los sueros bovinos frente a diferentes variantes virales de SARS-CoV-2 será evaluada a futuro utilizando los sVNTs desarrollados en esta tesis. Esto permitirá determinar qué tan diversa es la respuesta generada por las inmunizaciones con ectoS frente a variantes de SARS-CoV-2. A su vez, la información obtenida permitirá caracterizar mejor la colección de PBMCs aisladas de dichos animales para hacer una selección con antígenos específicos y una amplificación de secuencias de UL-CDRH3 que podrán ser expresadas en formato scFv, para dar lugar a posibles nuevos péptidos con actividad neutralizante frente a múltiples variantes virales.

## 5.5. METODOLOGÍA

### 5.5.1. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Todos los genes fueron sintetizados por Genscript luego de optimizar el uso de codones para *Drosophila melanogaster* y se clonaron en un vector de expresión pMT/V5-His (Invitrogen) inmediatamente después de la secuencia BiP para dirigir su secreción al espacio extracelular y conteniendo un Twin-Strep-tag® (IBA) y un codón STOP en el extremo C-terminal, tal como se describió previamente (Krey et al., 2010).

Para las construcciones de ectoS-ST monomérica y trimérica se utilizó la secuencia de ADN que codifica los aminoácidos 15-1213 de la glicoproteína Spike de SARS-CoV-2 (Wuhan) (GenBank: MN908947.3), con las sustituciones R682N y R683N para mutar el sitio de corte por furina, y las sustituciones K986P y K986P para estabilizar el estado pre-fusión del ectodominio. En el caso del ectoS-ST trimérico se incluyó la secuencia codificante del dominio de trimerización de fibritina del bacteriófago T4 (*foldon*) (Meier et al., 2004) después del residuo 1213 de ectoS.

Para la construcción del VHHV-scFc se clonó la secuencia codificante del Nanobody VHH-V (Koenig et al., 2021) seguida por la secuencia codificante de los dominios CH2 y CH3 de IgG humanas duplicadas, dispuestas en tándem y separadas por un linker flexible para generar un scFc de acuerdo con (Macpherson et al., 2020).

Por su parte, las secuencias codificantes del dominio V<sub>H</sub> bovino conteniendo un UL-CDRH3 específico por RBD de SARS-CoV-2 (clon SKD) y el dominio V<sub>L</sub> bovino, reportadas por (R. Huang et al., 2023), fueron clonadas en el plásmido diseñado por (Gilmartin et al., 2012) (basado en el pMT/V5-His), sustituyendo los respectivos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> humanos específicos por la proteína E2 en la construcción original

Las construcciones sintetizadas en este capítulo se presentan de forma esquemática en las **Figura 34. A**, **Figura 35.A** y **Figura 37.A**.

### 5.5.2. PRODUCCION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Al igual que en capítulos anteriores, se obtuvieron líneas celulares S2 estables que expresan y secretan las respectivas proteínas fusionadas a *Strep-tag*, mediante co-transfección con el respectivo vector de expresión y un plásmido de selección a puromicina (pCoPuro). Para ello se utilizó un electroporador de alta eficiencia Maxcyte STx, con 200 µg/mL plásmido de expresión y 100 µg/mL de plásmido de selección en cubetas OC-400. Las células transfectadas se seleccionaron a 28°C en medio Insect Xpress (LONZA) complementado con 6 µg/mL de puromicina y las líneas celulares S2 estables se cultivaron en matraces

de vidrio a 28°C con agitación a 110 rpm en un agitador orbital estándar y se indujeron a  $5 \times 10^6$  células/mL con  $5 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . Tras cuatro días de inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 150 g durante 5 minutos, y las proteínas se purificaron desde el sobrenadante del cultivo por cromatografía de afinidad (AC). Para ello, los sobrenadantes de cultivo se centrifugaron a 6.000 g, se filtraron a través de  $0,22 \mu\text{m}$  y se purificaron en columnas Strep-Tactin®XT 4Flow® de 5mL (IBA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El VHHV/scFc-ST y el SKDscFv-ST se sometieron a cromatografía de exclusión molecular (SEC) en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA (buffer de almacenamiento), utilizando columnas Superdex 200 (10-300) y Superdex 75 (10-300) (Cytiva), respectivamente y colectando las fracciones correspondientes a diferentes estados oligoméricos.

En el caso de ectoS monomérico utilizado para inmunizar vacas, el Strep-tag se eliminó mediante incubación *overnight* a 25°C con enteroquinasa-His (Genscript) (a  $200 \text{ U mg}^{-1}$ ), seguido de diálisis extensiva en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl e incubación con Ni-Sepharose® (Cytiva) durante 2 horas. Finalmente, la muestra filtrada por  $0,22 \mu\text{m}$  se sometió a un segundo paso de purificación por AC en 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA (buffer de almacenamiento) colectando la fracción no unida. La ectoS<sup>clv</sup> fue cuantificada, diluida en PBS a una concentración final de  $78 \mu\text{g/mL}$  y esterilizada por filtración a  $0,22 \mu\text{m}$ .

### 5.5.3. ANALISIS DE PUREZA Y TAMAÑO

#### 5.5.3.1. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Las proteínas purificadas se sometieron a SDS-PAGE al 12% (con DTT 0,1M cuando fue necesario) y se analizaron posteriormente mediante tinción con Coomassie. En el caso de los sobrenadantes de cultivo inducidos, se analizó la presencia de las proteínas correspondientes mediante *western blot* utilizando Streptactin-HRP (IBA) según las recomendaciones del fabricante.

#### 5.5.3.2. DISPERSION DINÁMICA DE LUZ

El radio hidrodinámico ( $R_H$ ) se analizó por dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un Zetasizer Nano S (Malvern). Las mediciones se realizaron por triplicado utilizando cubetas de plástico descartables UVette (Eppendorf) a 25°C.

### 5.5.4. ANALISIS DE TERMOESTABILIDAD

La termoestabilidad de las proteínas recombinantes se evaluó mediante fluorimetría diferencial de barrido en nanoescala (nanoDSF) en un Prometheus NT.48 (Nanotemper) y los valores de  $T_M$  para los procesos de desnaturalización se obtuvieron mediante calentamiento de las muestras a  $1^\circ\text{C/min}$  entre  $25-90^\circ\text{C}$ .

## 5.5.5. ANÁLISIS CUALITATIVO DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS

### 5.5.5.1. RESONANCIA DE PLASMÓNICA DE SUPERFICIE

Para evaluar la funcionalidad del VHHV/scFc producido en células S2 realizaron experimentos de SPR utilizando un Biacore 1K+ a 25°C con un flujo de 30 µL/min. Como buffer de corrida se utilizó 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% (v/v) P20, y el sensorchips utilizado fue de tipo Protein A (Cytiva).

Las tres fracciones de SEC (correspondientes a distintos estados de oligomerización de VHHV/scFc) se diluyeron entre 10 y 50 veces en buffer de corrida y se inyectaron durante 1 minuto sobre las superficies 2, 3 y 4 para capturar densidades de 188, 397 y 385 RUs, respectivamente. Cuando fue necesario se realizó más de una inyección de ligando con el propósito de aumentar la densidad de ligando capturado y la superficie 1 se dejó como referencia en línea (sin VHHV/scFc). A continuación, se inyectó <sup>Wuhan</sup>RBD-ST (purificado de acuerdo con la sección 2.3.1) durante tres minutos sobre todas las superficies, registrándose la disociación durante 9 minutos. También se hicieron inyecciones idénticas con buffer y los sensorgramas resultantes se obtuvieron mediante doble referenciamiento. El análisis de los resultados se hizo con el software Biacore Insight Evaluation (Cytiva).

### 5.5.5.2. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR ANALÍTICA

Para evidenciar la formación de complejos moleculares entre <sup>Wuhan</sup>RBD-ST (purificado de acuerdo con la sección 2.3.1) y SKDscFv, se hicieron corridas de SEC analítica, inyectando de ambas proteínas en forma individual (como control) y luego de ser pre-incubadas juntas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron con una columna Superdex 75 (10-300) (Cytiva) equilibrada en buffer 0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA a un flujo de 0,8 mL/min, con inyecciones de 100 µL conteniendo 160 pmoles de cada especie. El peso molecular fue estimado utilizando kits de calibración para alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) (Cytiva), que fueron inyectados en iguales condiciones.

## 5.5.6. INMUNIZACIÓN DE VACAS

Para las inmunizaciones de vacas se contó con la colaboración de la empresa Laboratorios Microsules Uruguay S.A, quienes proporcionaron los animales y las instalaciones para llevar a cabo los experimentos de vacunación y extracción de sangre. Se utilizaron 4 bovinos de 8-12 meses de edad (160-200 kg), los cuales se dividieron en 2 grupos: un grupo inmunizado solo con adyuvante (grupo “control” conformado por los animales #2060 y #2057) y un grupo inmunizado con ectoS<sup>clv</sup> + adyuvante (grupo “ectoS” conformado por los animales #2032 y #2034). Las inyecciones para el grupo control se prepararon con Luminigel diluido al 10 % en PBS mientras que las emulsiones para el grupo ectoS se prepararon con 5,4

mL de ectoS<sup>clv</sup> a 78 µg/mL y 0,6 mL de Luminagel. Cada animal se inmunizó mediante inyección intramuscular con 5 mL de emulsión (10% de adyuvante o 350 µg totales de antígeno + 10% de adyuvante). Luego de cada inmunización primaria, los esquemas de inmunización siguieron de acuerdo a 2 protocolos diferentes (identificados como protocolos #1 y #2 de acuerdo con la **Figura 36.A**).

Las subsiguientes inyecciones de refuerzo (*boosters*) se realizaron con la misma cantidad de antígeno y adyuvante, a los días 30 y 50 días del inicio del protocolo #1 (2 boosters; vaca #2060 control y vaca #2032 ectoS) o a los 47, 77 y 108 días del inicio del protocolo #2 (3 boosters; vaca #2057 control y vaca #2034 ectoS). Los bovinos se sangraron previo al inicio de cada protocolo de inmunización (sangrado pre-inmune) y luego de 30, 50 y 69 días del inicio del protocolo #1 o a los 53, 77 y 108 días del inicio del protocolo #2. Además se hizo un sangrado final al día 159 y 201 del inicio de los respectivos protocolos.

Los sangrados se llevaron a cabo mediante punción de la vena yugular y las muestras de sangre se colectarán en simultáneo para cada animal, en tubos con anticoagulante (para extracción de sangre total) y sin anticoagulante (para extracción de suero).

El aislamiento de PBMC se realizó a partir de las muestras de sangre total mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll (Histopaque, densidad 1.077 g/mL). Luego de separadas, las PBMC se contaron y se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido. Por su parte, las muestras de suero fueron congeladas en -20°C para analizar los niveles de anticuerpos específicos y la capacidad neutralizante.

### **5.5.7. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG BOVINOS ESPECÍFICOS POR ELISA**

Los títulos de IgG específicos contra RBD de SARS-CoV-2 fueron analizados por ELISA en muestras de suero de las vacas sometidas al protocolo de inmunización #1. Para ello se sensibilizaron placas NUNC Maxisorp (Thermo) con 0,1 µg de <sup>Wuhan</sup>RBD<sup>clv</sup> por pocillo (purificado de acuerdo con la sección 2.3.1 y diluido en PBS). La sensibilización se hizo *overnight* a 4°C y luego de 5 lavados con PBS-Tween 0.2%, se bloqueó con PBS-leche en polvo 3%-Tween 0.2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubaron los sueros bovinos durante 1 hora a temperatura ambiente (diluciones seriadas a 1:3 a partir de una dilución inicial 1:10 en PBS-leche en polvo 3%-Tween 0.2%). Luego de repetir los lavados se agregaron 100 µL de una dilución 1:10.000 de anticuerpo secundario anti-IgG bovino conjugado a HRP en PBS-Leche en polvo 3%-Tween 0.2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado final con PBS + 0,2% Tween20, las placas se incubaron con sustrato líquido TMB (Sigma) durante 15 minutos y la reacción colorimétrica se frenó con 50 µL de ácido sulfúrico 11%. Las absorbancias a 450nm y 620nm se midieron

en un lector de placas (Thermo) y los resultados se expresaron como la sustracción de las medidas realizadas a ambas longitudes de onda.

### **5.5.8. ENSAYOS ALTERNATIVOS DE NEUTRALIZACIÓN VIRAL (sVNT)**

Los sVNTs desarrollados en el capítulo anterior fueron utilizados para evaluar la capacidad bloqueante de la interacción RBD:hACE2 tanto de los sueros bovinos de todas las vacas inmunizadas con ectoS como del SKD-scFv producido en células S2.

Para ello se sensibilizaron microplacas NUNC Maxisorp (Thermo) con hACE2-Fc a 25 µg/mL *overnight* a 4°C, en PBS. Las placas se lavaron con PBS 0,05% Tween20 y se bloquearon *overnight* a 4°C con buffer de bloqueo para ELISA (Immunochemistry Technologies).

Tanto los sueros bovinos como el SKDscFv-ST se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con Streptactina-HRP (IBA) diluida 1:5000 en presencia de <sup>Wuhan</sup>RBD-ST a una concentración final de 0,1µg/mL en buffer estabilizante para conjugados HRP (Immunochemistry Technologies). Los sueros bovinos se preincubaron a diluciones finales de 1:10 y 1:100 mientras que para el SKD-scFv se utilizaron concentraciones de 1,7nM y 3,4nM (correspondientes a relaciones molares de 1:1 y 2:1 respecto a RBD-ST). Después de este período, los complejos se incorporaron a los pocillos con hACE2-Fc y se incubaron otros 30 minutos, para lavar y revelar con sustrato líquido TMB (Sigma) durante 15 minutos. La reacción colorimétrica se frenó con 50 µL de ácido sulfúrico 11% y las absorbancias a 450nm y 620nm se midieron en un lector de placas (Thermo) expresando los resultados como la sustracción de las medidas realizadas a ambas longitudes de onda.

## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

---

- Abd El-Aziz, T. M., Al-Sabi, A., & Stockand, J. D. (2020). Human recombinant soluble ACE2 (hrsACE2) shows promise for treating severe COVID19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00374-6>
- Ai, J. W., Zhang, Y., Zhang, H. C., Xu, T., & Zhang, W. H. (2020). Era of molecular diagnosis for pathogen identification of unexplained pneumonia, lessons to be learned. In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 9, Issue 1, pp. 597–600). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1738905>
- Alejandro Lagunas-Rangel, F., & Chávez-Valencia, V. (2021). What do we know about the antibody responses to SARS-CoV-2? *Immunobiology*, 226(2), 152054. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152054>
- Amanat, F., & Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*, 52(4), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007>
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczynszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydilto, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoeber, J., Liu, S. T. H., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
- Andreano, E., Piccini, G., Licastro, D., Casalino, L., Johnson, N. V., Paciello, I., Monego, S. D., Pantano, E., Manganaro, N., Manenti, A., Manna, R., Casa, E., Hyseni, I., Benincasa, L., Montomoli, E., Amaro, R. E., McLellan, J. S., & Rappuoli, R. (2020). SARS-CoV-2 escape in vitro from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 2020.12.28.424451. <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424451>
- Argentinian Anticovid Consortium. (2020). *Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in Pichia pastoris and mammalian cells*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78711-6>
- Arras, P., Zimmermann, J., Lipinski, B., Yanakieva, D., Klewinghaus, D., Krah, S., Kolmar, H., Pekar, L., & Zielonka, S. (2023). *Isolation of Antigen-Specific Unconventional Bovine Ultra-Long CDR3H*

*Antibodies Using Cattle Immunization in Combination with Yeast Surface Display* (pp. 113–129).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3279-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3279-6_8)

- Astray, R. M., Suárez-Patiño, S. F., & Jorge, S. A. C. (2016). Expression of viral envelope glycoproteins in *Drosophila melanogaster* S2 cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1432, pp. 103–118). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3637-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3637-3_7)
- Azkur, A. K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M., Veen, W., Brügggen, M., O'Mahony, L., Gao, Y., Nadeau, K., & Akdis, C. A. (2020). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, *75*(7), 1564–1581. <https://doi.org/10.1111/all.14364>
- Bagdonaite, I., Thompson, A. J., Wang, X., Søggaard, M., Fougereux, C., Frank, M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Salanti, A., Vakhrushev, S. Y., Paulson, J. C., & Wandall, H. H. (2021). Site-specific o-glycosylation analysis of sars-cov-2 spike protein produced in insect and human cells. *Viruses*, *13*(4).  
<https://doi.org/10.3390/v13040551>
- Barnes, C. O., Jette, C. A., Abernathy, M. E., Dam, K. M. A., Esswein, S. R., Gristick, H. B., Malyutin, A. G., Sharaf, N. G., Huey-Tubman, K. E., Lee, Y. E., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., West, A. P., & Bjorkman, P. J. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*, *588*(7839), 682–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1>
- Barre, A., Klonjowski, B., Benoist, H., & Rougé, P. (2022). How Do Point Mutations Enhancing the Basic Character of the RBDs of SARS-CoV-2 Variants Affect Their Transmissibility and Infectivity Capacities? *Viruses*, *14*(4), 783. <https://doi.org/10.3390/v14040783>
- Barroso, R., Morrison, W. I., & Morrison, L. J. (2020). Molecular Dissection of the Antibody Response: Opportunities and Needs for Application in Cattle. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1175.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01175>
- Baum, A., Fulton, B. O., Wloga, E., Copin, R., Pascal, K. E., Russo, V., Giordano, S., Lanza, K., Negron, N., Ni, M., Wei, Y., Atwal, G. S., Murphy, A. J., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., & Kyratsous, C. A. (2020). Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*, *369*(6506), 1014–1018. <https://doi.org/10.1126/science.abd0831>
- Beigel, J. H., Voell, J., Kumar, P., Raviprakash, K., Wu, H., Jiao, J. A., Sullivan, E., Luke, T., & Davey, R. T. (2018). Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from transchromosomal cattle: a phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(4), 410–418. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30002-1)
- Boroduske, A., Jekabsons, K., Riekstina, U., Muceniece, R., Rostoks, N., & Nakurte, I. (2021). Wild *Sambucus nigra* L. from north-east edge of the species range: A valuable germplasm with inhibitory capacity against SARS-CoV2 S-protein RBD and hACE2 binding in vitro. *Industrial Crops and Products*, *165*, 113438. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113438>

- Boucher, L. E., Prinslow, E. G., Feldkamp, M., Yi, F., Nanjunda, R., Wu, S.-J., Liu, T., Lacy, E. R., Jacobs, S., Kozlyuk, N., Del Rosario, B., Wu, B., Aquino, P., Davidson, R. C., Heyne, S., Mazzanti, N., Testa, J., Diem, M. D., Gorre, E., ... Luo, J. (2023). "Stapling" scFv for multispecific biotherapeutics of superior properties. *MAbs*, 15(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2195517>
- Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N. M. A., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A. E. H., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooi, A., van Schooten, J., ... van Gils, M. J. (2020). Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*, 369(6504), 643–650. <https://doi.org/10.1126/science.abc5902>
- Burke, M. J., Scott, J. N. F., Minshull, T. C., Gao, Z., Manfield, I., Savic, S., Stockley, P. G., Calabrese, A. N., & Boyes, J. (2022). A bovine antibody possessing an ultralong complementarity-determining region CDRH3 targets a highly conserved epitope in sarbecovirus spike proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 298(12), 102624. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102624>
- Burke, M. J., Stockley, P. G., & Boyes, J. (2020). Broadly Neutralizing Bovine Antibodies: Highly Effective New Tools against Evasive Pathogens? *Viruses*, 12(4), 473. <https://doi.org/10.3390/v12040473>
- Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, 369(6511), 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>
- Cameroni, E., Bowen, J. E., Rosen, L. E., Saliba, C., Zepeda, S. K., Culap, K., Pinto, D., VanBlargan, L. A., De Marco, A., di Iulio, J., Zatta, F., Kaiser, H., Noack, J., Farhat, N., Czudnochowski, N., Havenar-Daughton, C., Sprouse, K. R., Dillen, J. R., Powell, A. E., ... Corti, D. (2022). Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*, 602(7898), 664–670. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04386-2>
- Cao, Y., Wang, J., Jian, F., Xiao, T., Song, W., Yisimayi, A., Huang, W., Li, Q., Wang, P., An, R., Wang, J., Wang, Y., Niu, X., Yang, S., Liang, H., Sun, H., Li, T., Yu, Y., Cui, Q., ... Xie, X. S. (2022). Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 602(7898), 657–663. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04385-3>
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., McLellan, J. S., Fadda, E., & Amaro, R. E. (2020). Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Central Science*, 6(10), 1722–1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>
- CDC. (2020). *Emerging SARS-CoV-2 Variants* | CDC. Center for Infectious Disease Research and Policy (CIDRAP). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/scientific-brief-emerging-variants.html>

- Cerutti, G., Guo, Y., Zhou, T., Gorman, J., Lee, M., Rapp, M., Reddem, E. R., Yu, J., Bahna, F., Bimela, J., Huang, Y., Katsamba, P. S., Liu, L., Nair, M. S., Rawi, R., Olia, A. S., Wang, P., Chuang, G.-Y., Ho, D. D., ... Shapiro, L. (2021). Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite. In *bioRxiv* (p. 2021.01.10.426120). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2021.01.10.426120>
- Chalkias, S., Harper, C., Vrbicky, K., Walsh, S. R., Essink, B., Brosz, A., McGhee, N., Tomassini, J. E., Chen, X., Chang, Y., Sutherland, A., Montefiori, D. C., Girard, B., Edwards, D. K., Feng, J., Zhou, H., Baden, L. R., Miller, J. M., & Das, R. (2022). A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19. *New England Journal of Medicine*, *387*(14), 1279–1291. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208343>
- Challen, R., Dyson, L., Overton, C. E., Guzman-Rincon, L. M., Hill, E. M., Stage, H. B., Brooks-Pollock, E., Pellis, L., Scarabel, F., Pascall, D. J., Blomquist, P., Tildesley, M., Williamson, D., Siegert, S., Xiong, X., Youngman, B., Juniper, Read, J. M., Gog, J. R., ... Danon, L. (2021). Early epidemiological signatures of novel SARS-CoV-2 variants: establishment of B.1.617.2 in England. *MedRxiv*, 2021.06.05.21258365. <https://doi.org/10.1101/2021.06.05.21258365>
- Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., Herbert, A. S., & Procko, E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, *369*(6508), 1261–1265. <https://doi.org/10.1126/science.abc0870>
- Chen, J., Miao, L., Li, J. M., Li, Y. Y., Zhu, Q. Y., Zhou, C. L., Fang, H. Q., & Chen, H. P. (2005). Receptor-binding domain of SARS-Cov spike protein: Soluble expression in E.coli, purification and functional characterization. *World Journal of Gastroenterology*, *11*(39), 6159–6164. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i39.6159>
- Cheng, M. P., Papenburg, J., Desjardins, M., Kanjilal, S., Quach, C., Libman, M., Dittrich, S., & Yansouni, C. P. (2020). Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. In *Annals of internal medicine* (Vol. 172, Issue 11, pp. 726–734). NLM (Medline). <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Cheng, S. M. S., Mok, C. K. P., Leung, Y. W. Y., Ng, S. S., Chan, K. C. K., Ko, F. W., Chen, C., Yiu, K., Lam, B. H. S., Lau, E. H. Y., Chan, K. K. P., Luk, L. L. H., Li, J. K. C., Tsang, L. C. H., Poon, L. L. M., Hui, D. S. C., & Peiris, M. (2022). Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nature Medicine*, *28*(3), 486–489. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01704-7>
- Chuck, C.-P., Wong, C.-H., Chow, L. M.-C., Fung, K.-P., Wayne, M. M.-Y., & Tsui, S. K.-W. (2009). Expression of SARS-coronavirus spike glycoprotein in *Pichia pastoris*. *Virus Genes*, *38*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0292-3>

- Consortium, A. A. (2020). Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 21779. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78711-6>
- Crawford, K. H. D., Eguia, R., Dingens, A. S., Loes, A. N., Malone, K. D., Wolf, C. R., Chu, H. Y., Tortorici, M. A., Veessler, D., Murphy, M., Pettie, D., King, N. P., Balazs, A. B., & Bloom, J. D. (2020). Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays. *Viruses*, *12*(5), 513. <https://doi.org/10.3390/v12050513>
- Cromer, D., Steain, M., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Kent, S. J., Triccas, J. A., Khoury, D. S., & Davenport, M. P. (2022). Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *The Lancet Microbe*, *3*(1), e52–e61. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00267-6)
- Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*, *50*(5), 1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>
- Cucunawangsih, C., Wijaya, R. S., Lugito, N. P. H., & Suriapranata, I. (2021). Antibody response to the inactivated SARS-CoV-2 vaccine among healthcare workers, Indonesia. *International Journal of Infectious Diseases*, *113*, 15–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.078>
- da Costa, C. B. P., Martins, F. J., da Cunha, L. E. R., Ratcliffe, N. A., Cisne de Paula, R., & Castro, H. C. (2021). COVID-19 and Hyperimmune sera: A feasible plan B to fight against coronavirus. *International Immunopharmacology*, *90*(November 2020), 107220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220>
- Dai, L., & Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 73–82). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
- Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., ... Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, *371*(6529), eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
- Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., Pearson, C. A. B., Russell, T. W., Tully, D. C., Washburne, A. D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K. L. M., van Zandvoort, K., Silverman, J. D., Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., Eggo, R. M., ... Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, *372*(6538). <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
- D’Cruz, R. J., Currier, A. W., & Sampson, V. B. (2020). Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 468. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00468>

- Deiss, T. C., Vadnais, M., Wang, F., Chen, P. L., Torkamani, A., Mwangi, W., Lefranc, M.-P., Criscitiello, M. F., & Smider, V. V. (2019). Immunogenetic factors driving formation of ultralong VH CDR3 in *Bos taurus* antibodies. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(1), 53–64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.117>
- Dejnirattisai, W., Huo, J., Zhou, D., Zahradník, J., Supasa, P., Liu, C., Duyvesteyn, H. M. E., Ginn, H. M., Mentzer, A. J., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., Dijokaite, A., Khan, S., Avinoam, O., Bahar, M., Skelly, D., Adele, S., Johnson, S. A., ... Srean, G. R. (2022). SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell*, *185*(3), 467–484.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.046>
- Dinc, H. O., Saltoglu, N., Can, G., Balkan, I. I., Budak, B., Ozbey, D., Caglar, B., Karaali, R., Mete, B., Tuyji Tok, Y., Ersoy, Y., Ahmet Kuskucu, M., Midilli, K., Ergin, S., & Kocazeybek, B. S. (2022). Inactive SARS-CoV-2 vaccine generates high antibody responses in healthcare workers with and without prior infection. *Vaccine*, *40*(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.051>
- Dong, X., Cao, Y., Lu, X., Zhang, J., Du, H., Yan, Y., Akdis, C. A., & Gao, Y. (2020). Eleven faces of coronavirus disease 2019. *Allergy*, *75*(7), 1699–1709. <https://doi.org/10.1111/all.14289>
- Dong, Y., Dai, T., Wei, Y., Zhang, L., Zheng, M., & Zhou, F. (2020). A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 237. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00352-y>
- Du, L., Zhao, G., Chan, C. C. S., Sun, S., Chen, M., Liu, Z., Guo, H., He, Y., Zhou, Y., Zheng, B. J., & Jiang, S. (2009). Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and *E. coli* cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. *Virology*, *393*(1), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.018>
- Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y., & Wang, H. (2020). The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Frontiers in Immunology*, *11*, 2593. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576622>
- Earle, K. A., Ambrosino, D. M., Fiore-Gartland, A., Goldblatt, D., Gilbert, P. B., Siber, G. R., Dull, P., & Plotkin, S. A. (2021). Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine*, *39*(32), 4423–4428. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.05.063>
- Edouard Mathieu, Hannah Ritchie, Lucas Rodés-Guirao, Cameron Appel, Charlie Giattino, Joe Hasell, Bobbie Macdonald, Saloni Dattani, Diana Beltekian, Esteban Ortiz-Ospina, & Max Roser. (2020). *Coronavirus Pandemic (COVID-19)*. <https://ourworldindata.org/coronavirus>
- Eldrid, C. F. S., Allen, J. D., Newby, M. L., & Crispin, M. (2021). Suppression of O-Linked Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike by Quaternary Structural Restraints. *Analytical Chemistry*, *93*(43), 14392–14400. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.1C01772>

- EMA. (2021a). *Comirnaty* | European Medicines Agency. EMA.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>
- EMA. (2021b). *COVID-19 Vaccine AstraZeneca: Pending EC decision* | European Medicines Agency. EMA.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-astrazeneca>
- EMA. (2021c). *COVID-19 Vaccine Moderna* | European Medicines Agency. EMA.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-moderna>
- Embregts, C. W. E., Verstrepen, B., Langermans, J. A. M., Böszörményi, K. P., Sikkema, R. S., de Vries, R. D., Hoffmann, D., Wernike, K., Smit, L. A. M., Zhao, S., Rockx, B., Koopmans, M. P. G., Haagmans, B. L., Kuiken, T., & GeurtsvanKessel, C. H. (2021). Evaluation of a multi-species SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, *13*, 100313.  
<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100313>
- Escribano, P., Álvarez-Uría, A., Alonso, R., Catalán, P., Alcalá, L., Muñoz, P., & Guinea, J. (2020). Detection of SARS-CoV-2 antibodies is insufficient for the diagnosis of active or cured COVID-19. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76914-5>
- Esposito, S., Gnocchi, M., Gagliardi, M., Affanni, P., Veronesi, L., Colucci, M. E., Neglia, C., Argentiero, A., & Principi, N. (2020). Therapeutic strategies against COVID-19. In *Acta Biomedica* (Vol. 91, Issue 3, pp. 1–17). Mattioli 1885. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10450>
- European Medicines Agency (EMA). (2021). *Treatments and Vaccines for COVID-19: Authorised Medicines*. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/treatments-vaccines-covid-19-authorised-medicines# covid-19-vaccines-section>
- Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D. da S., Mishra, S., Crispim, M. A. E., Sales, F. C. S., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R. J. G., Franco, L. A. M., Ramundo, M. S., de Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C. A. M., Manuli, E. R., ... Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, *372*(6544), 815–821. <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>
- FDA News Release. (2020a). *Moderna COVID-19 Vaccine* | FDA. FDA. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccine>
- FDA News Release. (2020b). *Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine* | FDA. FDA.  
<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccine>
- Forest-Nault, C., Koyuturk, I., Gaudreault, J., Pelletier, A., L'Abbé, D., Cass, B., Bisson, L., Burlacu, A., Delafosse, L., Stuiblé, M., Henry, O., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2022). Impact of the temperature on the interactions between common variants of the SARS-CoV-2 receptor binding

- domain and the human ACE2. *Scientific Reports*, 12(1), 11520. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15215-5>
- Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J. C. C., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., ... Nussenzweig, M. C. (2021). Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03207-w>
- Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., & Langlois, M. A. (2020). Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, 11, 3382. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.610688/BIBTEX>
- Garcia-Beltran, W. F., St. Denis, K. J., Hoelzemer, A., Lam, E. C., Nitido, A. D., Sheehan, M. L., Berrios, C., Ofoman, O., Chang, C. C., Hauser, B. M., Feldman, J., Roederer, A. L., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Schmidt, A. G., Iafrate, A. J., Naranbhai, V., & Balazs, A. B. (2022). mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell*, 185(3), 457-466.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.033>
- Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J. C., Turner, A. J., Raizada, M. K., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2020). Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. In *Circulation Research* (Vol. 126, Issue 10, pp. 1456–1474). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015>
- Ghosh, S., Dellibovi-Ragheb, T. A., Kerviel, A., Pak, E., Qiu, Q., Fisher, M., Takvorian, P. M., Bleck, C., Hsu, V. W., Fehr, A. R., Perlman, S., Achar, S. R., Straus, M. R., Whittaker, G. R., de Haan, C. A. M., Kehrl, J., Altan-Bonnet, G., & Altan-Bonnet, N. (2020).  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*, 183(6), 1520-1535.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.039>
- Gilmartin, A. A., Lamp, B., Rumenapf, T., Persson, M. A. A., Rey, F. A., & Krey, T. (2012). High-level secretion of recombinant monomeric murine and human single-chain Fv antibodies from *Drosophila* S2 cells. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(2), 59–66. <https://doi.org/10.1093/protein/gzr058>
- Glasgow, A., Glasgow, J., Limonta, D., Solomon, P., Lui, I., Zhang, Y., Nix, M. A., Rettko, N. J., Zha, S., Yamin, R., Kao, K., Rosenberg, O. S., Ravetch, J. V., Wiita, A. P., Leung, K. K., Lim, S. A., Zhou, X. X., Hobman, T. C., Kortemme, T., & Wells, J. A. (2020). Engineered ACE2 receptor traps and potentially neutralizes SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(45), 28046–28055. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2016093117/-/DCSUPPLEMENTAL>

- Gong, Y., Qin, S., Dai, L., & Tian, Z. (2021). The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 396. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00809-8>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. In *Nature Microbiology* (Vol. 5, Issue 4, pp. 536–544). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gorman, M. J., Patel, N., Guebre-Xabier, M., Zhu, A. L., Atyeo, C., Pullen, K. M., Loos, C., Goez-Gazi, Y., Carrion, R., Tian, J.-H., Yuan, D., Bowman, K. A., Zhou, B., Maciejewski, S., McGrath, M. E., Logue, J., Frieman, M. B., Montefiori, D., Mann, C., ... Alter, G. (2021). Fab and Fc contribute to maximal protection against SARS-CoV-2 following NVX-CoV2373 subunit vaccine with Matrix-M vaccination. *Cell Reports Medicine*, 2(9), 100405. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100405>
- Greinacher, A., Thiele, T., Warkentin, T. E., Weisser, K., Kyrle, P. A., & Eichinger, S. (2021). Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 384(22), 2092–2101. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2104840>
- Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
- Grishin, A. M., Dolgova, N. V., Landreth, S., Fiset, O., Pickering, I. J., George, G. N., Falzarano, D., & Cygler, M. (2022). Disulfide Bonds Play a Critical Role in the Structure and Function of the Receptor-binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Antigen. *Journal of Molecular Biology*, 434(2), 167357. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2021.167357>
- Gstöttner, C., Zhang, T., Resemann, A., Ruben, S., Pengelley, S., Suckau, D., Welsink, T., Wuhrer, M., & Domínguez-Vega, E. (2021). Structural and Functional Characterization of SARS-CoV-2 RBD Domains Produced in Mammalian Cells. *Analytical Chemistry*, 93(17), 6839–6847. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00893>
- Gu, H., Chen, Q., Yang, G., He, L., Fan, H., Deng, Y.-Q., Wang, Y., Teng, Y., Zhao, Z., Cui, Y., Li, Y., Li, X.-F., Li, J., Zhang, N.-N., Yang, X., Chen, S., Guo, Y., Zhao, G., Wang, X., ... Zhou, Y. (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*, 369(6511), 1603–1607. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>
- Guglielmi, G. (2020). Fast coronavirus tests: what they can and can't do. *Nature*, 585(7826), 496–498. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02661-2>

- Haakenson, J. K., Huang, R., & Smider, V. V. (2018). Diversity in the Cow Ultralong CDR H3 Antibody Repertoire. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01262>
- Han, P., Li, L., Liu, S., Wang, Q., Zhang, D., Xu, Z., Han, P., Li, X., Peng, Q., Su, C., Huang, B., Li, D., Zhang, R., Tian, M., Fu, L., Gao, Y., Zhao, X., Liu, K., Qi, J., ... Wang, P. (2022). Receptor binding and complex structures of human ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2. *Cell*, 185(4), 630-640.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.001>
- Han, P., Su, C., Zhang, Y., Bai, C., Zheng, A., Qiao, C., Wang, Q., Niu, S., Chen, Q., Zhang, Y., Li, W., Liao, H., Li, J., Zhang, Z., Cho, H., Yang, M., Rong, X., Hu, Y., Huang, N., ... Qi, J. (2021). Molecular insights into receptor binding of recent emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications*, 12(1), 6103. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26401-w>
- Harrison, R. L., & Jarvis, D. L. (2006). *Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins* (pp. 159–191). [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68005-6)
- Hartley, G. E., Edwards, E. S. J., Aui, P. M., Varese, N., Stojanovic, S., McMahon, J., Peleg, A. Y., Boo, I., Drummer, H. E., Hogarth, P. M., O’Hehir, R. E., & van Zelm, M. C. (2020). Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Science Immunology*, 5(54). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf8891>
- Hawkins, A., Joyce, C., Brady, K., Hold, A., Smith, A., Knight, M., Howard, C., van den Elsen, J., Lawson, A. D. G., & Macpherson, A. (2022). The proximity of the N- and C- termini of bovine knob domains enable engineering of target specificity into polypeptide chains. *MAbs*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2076295>
- He, Y., Qi, J., Xiao, L., Shen, L., Yu, W., & Hu, T. (2021). Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 21(6), 453–460. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000106>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hoffmann, M., Schroeder, S., Kleine-Weber, H., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: New treatment option for COVID-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00754-20>
- Hope, J. L., & Bradley, L. M. (2021). Lessons in antiviral immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6528), 464–465. <https://doi.org/10.1126/science.abf6446>

- Hsieh, C.-L., Goldsmith, J. A., Schaub, J. M., DiVenere, A. M., Kuo, H.-C., Javanmardi, K., Le, K. C., Wrapp, D., Lee, A. G., Liu, Y., Chou, C.-W., Byrne, P. O., Hjorth, C. K., Johnson, N. V., Ludes-Meyers, J., Nguyen, A. W., Park, J., Wang, N., Amengor, D., ... McLellan, J. S. (2020). Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science*, *369*(6510), 1501–1505. <https://doi.org/10.1126/science.abd0826>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, *395*(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, R., Warner Jenkins, G., Kim, Y., Stanfield, R. L., Singh, A., Martinez-Yamout, M., Kroon, G. J., Torres, J. L., Jackson, A. M., Kelley, A., Shaabani, N., Zeng, B., Bacica, M., Chen, W., Warner, C., Radoicic, J., Joh, J., Dinali Perera, K., Sang, H., ... Smider, V. V. (2023). The smallest functional antibody fragment: Ultralong CDR H3 antibody knob regions potently neutralize SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.2303455120>
- Huo, J., Le Bas, A., Ruza, R. R., Duyvesteyn, H. M. E., Mikolajek, H., Malinauskas, T., Tan, T. K., Rijal, P., Dumoux, M., Ward, P. N., Ren, J., Zhou, D., Harrison, P. J., Weckener, M., Clare, D. K., Vogirala, V. K., Radecke, J., Moynié, L., Zhao, Y., ... Naismith, J. H. (2020). Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*(9), 846–854. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0469-6>
- Ismail, A., Shurrab, F. M., Al-Jighefee, H. T., Al-Sadeq, D. W., Qotba, H., Al-Shaar, I. A., Yassine, H. M., Abu-Raddad, L. J., & Nasrallah, G. K. (2021). Can commercial automated immunoassays be utilized to predict neutralizing antibodies after SARS-CoV-2 infection? A comparative study between three different assays. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, *26*(7), 198–206. <https://doi.org/10.52586/4934>
- Jara, A., Undurraga, E. A., González, C., Paredes, F., Fontecilla, T., Jara, G., Pizarro, A., Acevedo, J., Leo, K., Leon, F., Sans, C., Leighton, P., Suárez, P., García-Escorza, H., & Araos, R. (2021). Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile. *New England Journal of Medicine*, *385*(10), 875–884. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107715>
- Java, A., Apicelli, A. J., Kathryn Liszewski, M., Coler-Reilly, A., Atkinson, J. P., Kim, A. H. J., & Kulkarni, H. S. (2020). The complement system in COVID-19: Friend and foe? *JCI Insight*, *5*(15). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140711>
- Jawhara, S. (2020). Can Drinking Microfiltered Raw Immune Milk From Cows Immunized Against SARS-CoV-2 Provide Short-Term Protection Against COVID-19? *Frontiers in Immunology*, *11*, 1888. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01888>

- Joyce, C., Speight, L., Lawson, A. D. G., Scott-Tucker, A., & Macpherson, A. (2023). *Phage Display of Bovine Ultralong CDRH3* (pp. 83–97). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3279-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3279-6_6)
- Jung, K., Shin, S., Nam, M., Hong, Y. J., Roh, E. Y., Park, K. U., & Song, E. Y. (2021). Performance evaluation of three automated quantitative immunoassays and their correlation with a surrogate virus neutralization test in coronavirus disease 19 patients and pre-pandemic controls. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(9). <https://doi.org/10.1002/jcla.23921>
- Kabadi, P. G., Sankaran, K., Palanivelu, D. V, Adhikary, L., Khedkar, A., & Chatterjee, A. (n.d.). Mass Spectrometry Based Mechanistic Insights into Formation of Tris Conjugates: Implications on Protein Biopharmaceutics. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1447-4>
- Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Lu, J. M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H. G., Scheres, S. H. W., Bartenschlager, R., & Briggs, J. A. G. (2020). Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, 588(7838), 498–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- Keech, C., Albert, G., Cho, I., Robertson, A., Reed, P., Neal, S., Plested, J. S., Zhu, M., Cloney-Clark, S., Zhou, H., Smith, G., Patel, N., Frieman, M. B., Haupt, R. E., Logue, J., McGrath, M., Weston, S., Piedra, P. A., Desai, C., ... Glenn, G. M. (2020). Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(24), 2320–2332. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920>
- Kertes, J., Gez, S. B., Saciuk, Y., Supino-Rosin, L., Stein, N. S., Mizrahi-Reuveni, M., & Zohar, A. E. (2022). Effectiveness of mRNA BNT162b2 Vaccine 6 Months after Vaccination among Patients in Large Health Maintenance Organization, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 338–346. <https://doi.org/10.3201/eid2802.211834>
- Khoury, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Subbarao, K., Kent, S. J., Triccas, J. A., & Davenport, M. P. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine*, 27(7), 1205–1211. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>
- Kim, Y., Lee, J. H., Ko, G. Y., Ryu, J. H., Jang, J. H., Bae, H., Yoo, S.-H., Choi, A.-R., Jung, J., Lee, J., & Oh, E.-J. (2021). Quantitative SARS-CoV-2 Spike Antibody Response in COVID-19 Patients Using Three Fully Automated Immunoassays and a Surrogate Virus Neutralization Test. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081496>
- Kitagawa, Y., Imai, K., Matsuoka, M., Fukada, A., Kubota, K., Sato, M., Takada, T., Noguchi, S., Tarumoto, N., Maesaki, S., Takeuchi, S., & Maeda, T. (2022). Evaluation of the correlation between the access SARS-CoV-2 IgM and IgG II antibody tests with the SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. *Journal of Medical Virology*, 94(1), 335–341. <https://doi.org/10.1002/jmv.27338>

- Kiyoshi, M., Tsumoto, K., Ishii-Watabe, A., & Caaveiro, J. M. M. (2017). Glycosylation of IgG-Fc: a molecular perspective. *International Immunology*, *29*(7), 311–317. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx038>
- Klausberger, M., Kienzl, N. F., Stadlmayr, G., Grünwald-Gruber, C., Laurent, E., Stadlbauer, K., Stracke, F., Vierlinger, K., Hofner, M., Manhart, G., Gerner, W., Grebien, F., Weinhäusel, A., Mach, L., & Wozniak-Knopp, G. (2022). Designed SARS-CoV-2 receptor binding domain variants form stable monomers. *Biotechnology Journal*, *2100422*. <https://doi.org/10.1002/BIOT.202100422>
- Koenig, P. A., Das, H., Liu, H., Kümmerer, B. M., Gohr, F. N., Jenster, L. M., Schiffelers, L. D. J., Tesfamariam, Y. M., Uchima, M., Wuerth, J. D., Gatterdam, K., Ruetalo, N., Christensen, M. H., Fandrey, C. I., Normann, S., Tödtmann, J. M. P., Pritzl, S., Hanke, L., Boos, J., ... Schmidt, F. I. (2021). Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science*, *371*(6530). <https://doi.org/10.1126/science.abe6230>
- Kohmer, N., Rühl, C., Ciesek, S., & Rabenau, H. F. (2021). Utility of Different Surrogate Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (sELISAs) for Detection of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/jcm10102128>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Angyal, A., Brown, R. L., Carrilero, L., ... Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, *182*(4), 812–827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
- Korn, J., Schäckermann, D., Kirmann, T., Bertoglio, F., Steinke, S., Heisig, J., Ruschig, M., Rojas, G., Langreder, N., Wenzel, E. V., Roth, K. D. R., Becker, M., Meier, D., van den Heuvel, J., Hust, M., Dübel, S., & Schubert, M. (2020). Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Scientific Reports*, *10*(1), 21393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>
- Kozlik, P., Goldman, R., & Sanda, M. (2017). Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *ELECTROPHORESIS*, *38*(17), 2193–2199. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201600547>
- Krammer, F., & Simon, V. (2020). Serology assays to manage COVID-19. *Science*, *368*(6495), 1060–1061. <https://doi.org/10.1126/science.abc1227>
- Krause, P. R., Fleming, T. R., Peto, R., Longini, I. M., Figueroa, J. P., Sterne, J. A. C., Cravioto, A., Rees, H., Higgins, J. P. T., Boutron, I., Pan, H., Gruber, M. F., Arora, N., Kazi, F., Gaspar, R., Swaminathan, S., Ryan, M. J., & Henao-Restrepo, A.-M. (2021). Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *The Lancet*, *398*(10308), 1377–1380. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02046-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02046-8)
- Krey, T., D'Alayer, J., Kikutu, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., Robert, B., England, P., Persson, M. A. A., Martin, A., & Rey, F. A. (2010). The disulfide

bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000762. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000762>

Kupferschmidt, K. (2021). New coronavirus variants could cause more reinfections, require updated vaccines. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.abg6028>

Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>

Le Bert, N., Tan, A. T., Kunasegaran, K., Tham, C. Y. L., Hafezi, M., Chia, A., Chng, M. H. Y., Lin, M., Tan, N., Linster, M., Chia, W. N., Chen, M. I.-C., Wang, L.-F., Ooi, E. E., Kalimuddin, S., Tambyah, P. A., Low, J. G.-H., Tan, Y.-J., & Bertoletti, A. (2020). SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 584(7821), 457–462. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>

Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C., Wang, Y., Li, L., Ren, L., Guo, F., Zhao, Z., Zhou, Z., Xiang, Z., & Wang, J. (2020). Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 11(1), 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>

Levin, E. G., Lustig, Y., Cohen, C., Fluss, R., Indenbaum, V., Amit, S., Doolman, R., Asraf, K., Mendelson, E., Ziv, A., Rubin, C., Freedman, L., Kreiss, Y., & Regev-Yochay, G. (2021). Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *New England Journal of Medicine*, 385(24). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114583>

Li, K., Wang, S., Cao, Y., Bao, H., Li, P., Sun, P., Bai, X., Fu, Y., Ma, X., Zhang, J., Li, D., Chen, Y., Liu, X., An, F., Wu, F., Lu, Z., & Liu, Z. (2019). Development of Foot-and-Mouth Disease Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Derived From Plasmablasts of Infected Cattle and Their Germline Gene Usage. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02870>

Li, L., Liao, H., Meng, Y., Li, W., Han, P., Liu, K., Wang, Q., Li, D., Zhang, Y., Wang, L., Fan, Z., Zhang, Y., Wang, Q., Zhao, X., Sun, Y., Huang, N., Qi, J., & Gao, G. F. (2022). Structural basis of human ACE2 higher binding affinity to currently circulating Omicron SARS-CoV-2 sub-variants BA.2 and BA.1.1. *Cell*, 185(16), 2952–2960.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.023>

Li, Q. (2020). An Outbreak of NCIP (2019-nCoV) Infection in China — Wuhan, Hubei Province, 2019–2020. *China CDC Weekly*, 2(5), 79–80. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.022>

Li, Q., Wu, J., Nie, J., Zhang, L., Hao, H., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Q., Liu, H., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, X., Sun, Q., Liu, J., Zhang, L., Li, X., Huang, W., & Wang, Y. (2020). The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*, 182(5), 1284–1294.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.012>

- Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Wu, D., Xue, W., Xiong, H., Huang, X., Nie, M., Yue, M., Rong, R., Zhang, S., Zhang, Y., Wu, Y., Wang, S., Zha, Z., Chen, T., Deng, T., Wang, Y., Zhang, T., ... Xia, N. (2020). SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 2076–2090. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>
- Li, W., Moore, M. J., Vasllieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greeneugh, T. C., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
- Liljavirta, J., Ekman, A., Knight, J. S., Pernthaner, A., Iivanainen, A., & Niku, M. (2013). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is strongly expressed in the fetal bovine ileal Peyer's patch and spleen and is associated with expansion of the primary antibody repertoire in the absence of exogenous antigens. *Mucosal Immunology*, 6(5), 942–949. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.132>
- Lim, W. W., Mak, L., Leung, G. M., Cowling, B. J., & Peiris, M. (2021). Comparative immunogenicity of mRNA and inactivated vaccines against COVID-19. *The Lancet Microbe*, 2(9), e423. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00177-4)
- Lima, A., Durán, R., Schujman, G. E., Marchissio, M. J., Portela, M. M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., & Cerveñansky, C. (2011). Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: Biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1720–1734. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2011.03.005>
- Lin, S., Chen, Z., Zhang, X., Wen, A., Yuan, X., Yu, C., Yang, J., He, B., Cao, Y., & Lu, G. (2022). Characterization of SARS-CoV-2 Omicron spike RBD reveals significantly decreased stability, severe evasion of neutralizing-antibody recognition but unaffected engagement by decoy ACE2 modified for enhanced RBD binding. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00914-2>
- Liu, H., Wei, P., Aviszus, K., Zhang, Q., Linderberger, J., Yang, J., Liu, J., Chen, Z., Waheed, H., Reynoso, L., Downey, G. P., Frankel, S. K., Kappler, J. W., Marrack, P., & Zhang, G. (2022). The Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Lambda Variant Has a Better Chance Than the Delta Variant in Evading BNT162b2 COVID-19 mRNA Vaccine-Induced Humoral Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11325. <https://doi.org/10.3390/ijms231911325>
- Liu, H., Wei, P., Kappler, J. W., Marrack, P., & Zhang, G. (2022). SARS-CoV-2 Variants of Concern and Variants of Interest Receptor Binding Domain Mutations and Virus Infectivity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.825256>
- Liu, H., Wei, P., Zhang, Q., Chen, Z., Aviszus, K., Downing, W., Peterson, S., Reynoso, L., Downey, G. P., Frankel, S. K., Kappler, J., Marrack, P., & Zhang, G. (2021). 501Y.V2 and 501Y.V3 variants of SARS-CoV-

2 lose binding to bamlanivimab *in vitro*. *MAbs*, 13(1).

<https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1919285>

Liu, H., Zhang, Q., Wei, P., Chen, Z., Aviszus, K., Yang, J., Downing, W., Jiang, C., Liang, B., Reynoso, L., Downey, G. P., Frankel, S. K., Kappler, J., Marrack, P., & Zhang, G. (2021). The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Research*, 31(6), 720–722.

<https://doi.org/10.1038/s41422-021-00496-8>

Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F. W., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K.-Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., ... Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450–456.

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>

Liu, Z., VanBlargan, L. A., Rothlauf, P. W., Bloyet, L. M., Chen, R. E., Stumpf, S., Zhao, H., Errico, J. M., Theel, E. S., Ellebedy, A. H., Fremont, D. H., Diamond, M. S., & Whelan, S. P. J. (2020). Landscape analysis of escape variants identifies SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. In *bioRxiv* (p. 2020.11.06.372037). bioRxiv.

<https://doi.org/10.1101/2020.11.06.372037>

Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., Dzharullaeva, A. S., Kovyrshina, A. V., Lubenets, N. L., Grousova, D. M., Erokhova, A. S., Botikov, A. G., Izhaeva, F. M., Popova, O., Ozharovskaya, T. A., Esmagambetov, I. B., Favorskaya, I. A., Zrelkin, D. I., Voronina, D. V., Shcherbinin, D. N., ... Gintsburg, A. L. (2021). Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*, 0(0). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00234-8)

Lorenzo, R., Defelipe, L. A., Aliperti, L., Niebling, S., Custódio, T. F., Löw, C., Schwarz, J. J., Remans, K., Craig, P. O., Otero, L. H., Klink, S., García-Alai, M., Sánchez, I. E., & Alonso, L. G. (2021). Deamidation drives molecular aging of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4), 101175. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101175>

Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M., & Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 18(1), 46–61.

<https://doi.org/10.1038/nri.2017.106>

Lu, Q., Zhang, Z., Li, H., Zhong, K., Zhao, Q., Wang, Z., Wu, Z., Yang, D., Sun, S., Yang, N., Zheng, M., Chen, Q., Long, C., Guo, W., Yang, H., Nie, C., & Tong, A. (2021). Development of multivalent nanobodies blocking SARS-CoV-2 infection by targeting RBD of spike protein. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00768-w>

Luke, T., Wu, H., Zhao, J., Channappanavar, R., Coleman, C. M., Jiao, J. A., Matsushita, H., Liu, Y., Postnikova, E. N., Ork, B. L., Glenn, G., Flyer, D., Defang, G., Raviprakash, K., Kochel, T., Wang, J., Nie, W., Smith, G., Hensley, L. E., ... Frieman, M. B. (2016). Human polyclonal immunoglobulin G from

transchromosomal bovine inhibits MERS-CoV in vivo. *Science Translational Medicine*, 8(326), 326ra21-326ra21. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1061>

- Lumley, S. F., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Warren, F., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Warren, L., Axten, D., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Sreaton, G., ... Eyre, D. W. (2020). Antibodies to SARS-CoV-2 are associated with protection against reinfection. In *medRxiv* (p. 2020.11.18.20234369). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.20234369>
- Lundstrom, K., Seyran, M., Pizzol, D., Adadi, P., Mohamed Abd El-Aziz, T., Hassan, Sk. S., Soares, A., Kandimalla, R., Tambuwala, M. M., Aljabali, A. A. A., Kumar Azad, G., Pal Choudhury, P., Uversky, V. N., Sherchan, S. P., Uhal, B. D., Rezaei, N., & Brufsky, A. M. (2020). The Importance of Research on the Origin of SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(11), 1203. <https://doi.org/10.3390/v12111203>
- Lv, H., Wu, N. C., Tsang, O. T.-Y., Yuan, M., Perera, R. A. P. M., Leung, W. S., So, R. T. Y., Chan, J. M. C., Yip, G. K., Chik, T. S. H., Wang, Y., Choi, C. Y. C., Lin, Y., Ng, W. W., Zhao, J., Poon, L. L. M., Peiris, J. S. M., Wilson, I. A., & Mok, C. K. P. (2020). Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Reports*, 31(9), 107725. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107725>
- Macpherson, A., Laabei, M., Ahdash, Z., Graewert, M. A., Birtley, J. R., Schulze, M.-S. E., Crennell, S., Robinson, S. A., Holmes, B., Oleinikovas, V., Nilsson, P. H., Snowden, J., Ellis, V., Mollnes, T. E., Deane, C. M., Svergun, D., Lawson, A. D., & van den Elsen, J. M. (2021). The allosteric modulation of complement C5 by knob domain peptides. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63586>
- Macpherson, A., Scott-Tucker, A., Spiliotopoulos, A., Simpson, C., Staniforth, J., Hold, A., Snowden, J., Manning, L., van den Elsen, J., & Lawson, A. D. G. (2020). Isolation of antigen-specific, disulphide-rich knob domain peptides from bovine antibodies. *PLOS Biology*, 18(9), e3000821. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000821>
- Maffei, M., Montemiglio, L. C., Vitagliano, G., Fedele, L., Sellathurai, S., Bucci, F., Compagnone, M., Chiarini, V., Exertier, C., Muzi, A., Roscilli, G., Vallone, B., & Marra, E. (2021). The nuts and bolts of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain heterologous expression. *Biomolecules*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biom11121812>
- Magro, P., Zanella, I., Pescarolo, M., Castelli, F., & Quiros-Roldan, E. (2020). Lopinavir/ritonavir: Repurposing an old drug for HIV infection in COVID-19 treatment. *Biomedical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.005>
- Mamedov, T., Yuksel, D., Ilgin, M., Gürbüzaslan, İ., Gulec, B., Mammadova, G., Say, D., & Hasanova, G. (2020). Engineering, production and characterization of Spike and Nucleocapsid structural proteins of SARS-CoV-2 in *Nicotiana benthamiana* as vaccine candidates against COVID-19. *BioRxiv*, 2020.12.29.424779. <https://doi.org/10.1101/2020.12.29.424779>

- Matthay, M. A., & Thompson, B. T. (2020). Dexamethasone in hospitalised patients with COVID-19: addressing uncertainties. *The Lancet Respiratory Medicine*, *8*(12), 1170–1172. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30503-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30503-8)
- McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., Walls, A. C., Beltramello, M., Chen, A., Liu, Z., Zatta, F., Zepeda, S., di Iulio, J., Bowen, J. E., Montiel-Ruiz, M., Zhou, J., Rosen, L. E., Bianchi, S., Guarino, B., Fregni, C. S., ... Veessler, D. (2021). N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*, *184*(9), 2332–2347.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.028>
- Medeiros, A., Benítez, D., Korn, R. S., Ferreira, V. C., Barrera, E., Carrión, F., Pritsch, O., Pantano, S., Kunick, C., de Oliveira, C. I., F Orban, O. C., Comini, M. A., Ben itez Ñ, D., & Carri on, F. (2020). Mechanistic and biological characterisation of novel N 5-substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in Leishmania. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *35*(1), 1345–1358. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1780227>
- Meier, S., Güthe, S., Kiefhaber, T., & Grzesiek, S. (2004). Foldon, The Natural Trimerization Domain of T4 Fibrin, Dissociates into a Monomeric A-state Form containing a Stable  $\beta$ -Hairpin: Atomic Details of Trimer Dissociation and Local  $\beta$ -Hairpin Stability from Residual Dipolar Couplings. *Journal of Molecular Biology*, *344*(4), 1051–1069. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.079>
- Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I. A. T. M., Goonawardane, N., Saito, A., Kimura, I., Yamasoba, D., Gerber, P. P., Fatihi, S., Rathore, S., Zepeda, S. K., Papa, G., Kemp, S. A., Ikeda, T., Toyoda, M., Tan, T. S., Kuramochi, J., Mitsunaga, S., Ueno, T., ... Gupta, R. K. (2022). Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature*, *603*(7902), 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>
- Meyer, B., Reimerink, J., Torriani, G., Brouwer, F., Godeke, G. J., Yerly, S., Hoogerwerf, M., Vuilleumier, N., Kaiser, L., Eckerle, I., & Reusken, C. (2020). Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 2394. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
- Mi, Y., Xie, T., Zhu, B., Tan, J., Li, X., Luo, Y., Li, F., Niu, H., Han, J., Lv, W., & Wang, J. (2021). Production of SARS-CoV-2 virus-like particles in insect cells. *BioRxiv*, 2021.01.30.428979. <https://doi.org/10.1101/2021.01.30.428979>
- Micsonai, A., Bulyáki, É., & Kardos, J. (2021). *BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy* (pp. 175–189). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11)
- Micsonai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadász, H., Murvai, N., Lee, Y.-H., Molnár, T., Réfrégiers, M., Goto, Y., Tantos, Á., & Kardos, J. (2022). BeStSel: webserver for secondary structure and fold

prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W90–W98.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac345>

Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., & Kardos, J. (2018). BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W315–W322.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky497>

Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (n.d.). *ANMAT autorizó el suero equino hiperinmune para tratar pacientes con COVID-19 | Argentina.gob.ar*. Retrieved February 17, 2021, from <https://www.argentina.gob.ar/noticias/anmat-autorizo-el-suero-equino-hiperinmune-para-tratar-pacientes-con-covid-19>

Mizukami, A., Caron, A. L., Picanço-Castro, V., & Swiech, K. (2018). Platforms for Recombinant Therapeutic Glycoprotein Production. In V. Picanço-Castro & K. Swiech (Eds.), *Recombinant Glycoprotein Production. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1674, pp. 1–14). Humana Press Inc.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_1)

Mok, C. K. P., Cohen, C. A., Cheng, S. M. S., Chen, C., Kwok, K., Yiu, K., Chan, T., Bull, M., Ling, K. C., Dai, Z., Ng, S. S., Lui, G. C., Wu, C., Amarasinghe, G. K., Leung, D. W., Wong, S. Y. S., Valkenburg, S. A., Peiris, M., & Hui, D. S. (2022). Comparison of the immunogenicity of <scp>BNT162b2</scp> and <scp>CoronaVac COVID</scp> -19 vaccines in Hong Kong. *Respirology*, 27(4), 301–310.  
<https://doi.org/10.1111/resp.14191>

Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Hurtado del Pozo, C., Prosper, F., Romero, J. P., Wirnsberger, G., Zhang, H., Slutsky, A. S., Conder, R., Montserrat, N., Mirazimi, A., & Penninger, J. M. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*, 181(4), 905-913.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.004>

Moro-Pérez, L., Boggiano-Ayo, T., Lozada-Chang, S. L., Fernández-Saiz, O. L., de la Luz, K. R., & Gómez-Pérez, J. A. (2023). Conformational characterization of the mammalian-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor binding domain, a COVID-19 vaccine. *Biological Research*, 56(1), 22.  
<https://doi.org/10.1186/s40659-023-00434-5>

Moulana, A., Dupic, T., Phillips, A. M., Chang, J., Roffler, A. A., Greaney, A. J., Starr, T. N., Bloom, J. D., & Desai, M. M. (2023). The landscape of antibody binding affinity in SARS-CoV-2 Omicron BA.1 evolution. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.83442>

Münsterkötter, L., Hollstein, M. M., Hahn, A., Kröger, A., Schnelle, M., Erpenbeck, L., Groß, U., Frickmann, H., & Zautner, A. E. (2022). Comparison of the Anti-SARS-CoV-2 Surrogate Neutralization Assays by TECOmedical and DiaPROPH-Med with Samples from Vaccinated and Infected Individuals. *Viruses* 2022, Vol. 14, Page 315, 14(2), 315. <https://doi.org/10.3390/V14020315>

- Murray, M. J., McIntosh, M., Atkinson, C., Mahungu, T., Wright, E., Chatterton, W., Gandy, M., & Reeves, M. B. (2021). Validation of a commercially available indirect assay for SARS-CoV-2 neutralising antibodies using a pseudotyped virus assay. *Journal of Infection*, *82*(5), 170–177. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2021.03.010>
- Muruato, A. E., Fontes-Garfias, C. R., Ren, P., Garcia-Blanco, M. A., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P. Y. (2020). A high-throughput neutralizing antibody assay for COVID-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nature Communications*, *11*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17892-0>
- Muthamilselvan, T., Kim, J. S., Cheong, G., & Hwang, I. (2019). Production of recombinant proteins through sequestration in chloroplasts: a strategy based on nuclear transformation and post-translational protein import. *Plant Cell Reports*, *38*(7), 825–833. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02431-z>
- Nagar, G., Jain, S., Rajurkar, M., Lothe, R., Rao, H., Majumdar, S., Gautam, M., Rodriguez-Aponte, S. A., Crowell, L. E., Love, J. C., Dandekar, P., Puranik, A., Gairola, S., Shaligram, U., & Jain, R. (2023). Large-Scale Purification and Characterization of Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in Yeast. *Vaccines*, *11*(10), 1602. <https://doi.org/10.3390/vaccines11101602>
- National Institutes of Health. (2024, February 24). *COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
- Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., Zhang, L., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, X., Sun, Q., Liu, J., Fan, C., Huang, W., Xu, M., & Wang, Y. (2020). Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 680–686. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1743767>
- Nutalai, R., Zhou, D., Tuekprakhon, A., Ginn, H. M., Supasa, P., Liu, C., Huo, J., Mentzer, A. J., Duyvesteyn, H. M. E., Djokaite-Guraliuc, A., Skelly, D., Ritter, T. G., Amini, A., Bibi, S., Adele, S., Johnson, S. A., Constantinides, B., Webster, H., Temperton, N., ... Sreaton, G. R. (2022). Potent cross-reactive antibodies following Omicron breakthrough in vaccinees. *Cell*, *185*(12), 2116–2131.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.014>
- Oguntuyo, K. Y., Stevens, C. S., Hung, C. T., Ikegame, S., Acklin, J. A., Kowdle, S. S., Carmichael, J. C., Chiu, H.-P., Azarm, K. D., Haas, G. D., Amanat, F., Klingler, J., Baine, I., Arinsburg, S., Bandres, J. C., Siddiquey, M. N. A., Schilke, R. M., Woolard, M. D., Zhang, H., ... Lee, B. (2021). Quantifying Absolute Neutralization Titers against SARS-CoV-2 by a Standardized Virus Neutralization Assay Allows for Cross-Cohort Comparisons of COVID-19 Sera. *MBio*, *12*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1128/mBio.02492-20>
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., Geurtsvankessel, C. H., Corman, V. M., Lamers, M. M., Sikkema, R. S., Bruin, E. De, Chandler, F. D., Yazdanpanah, Y., Hingrat, Q. Le, Descamps, D., Houhou-

- Fidouh, N., Reusken, C. B. E. M., Bosch, B. J., Drosten, C., Koopmans, M. P. G., & Haagmans, B. L. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(7), 1478–1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
- Olaleye, O. A., Kaur, M., Onyenaka, C., & Adebusuyi, T. (2021). Discovery of Clioquinol and analogues as novel inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infection, ACE2 and ACE2 - Spike protein interaction in vitro. *Heliyon*, *7*(3). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06426>
- Olaleye, O. A., Kaur, M., & Onyenaka, C. C. (2020). Ambroxol Hydrochloride Inhibits the Interaction between Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein's Receptor Binding Domain and Recombinant Human ACE2. *BioRxiv*, 2020.09.13.295691. <https://doi.org/10.1101/2020.09.13.295691>
- Olivero-Deibe, N., Tomé-Poderti, L., Carrión, F., Bianchi, S., Fló, M., Prieto, D., Rammauro, F., Addiego, A., Ibañez, N., Portela, M., Duran, R., Berois, M., & Pritsch, O. (2021). Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in Drosophila S2 Cells. *Frontiers in Virology*, *1*. <https://doi.org/10.3389/fviro.2021.756559>
- Ortega, C., Prieto, D., Abreu, C., Oppezzo, P., & Correa, A. (2018). Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01384>
- Palakurthi Biological Limited, K. E., Vikram Paradkar Biological Limited, H. E., & Priya Abraham, H. (2020). *Development of equine antisera with high neutralizing activity against SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-83582/v1>
- Pallesen, J., Wang, N., Corbett, K. S., Wrapp, D., Kirchdoerfer, R. N., Turner, H. L., Cottrell, C. A., Becker, M. M., Wang, L., Shi, W., Kong, W.-P., Andres, E. L., Kettenbach, A. N., Denison, M. R., Chappell, J. D., Graham, B. S., Ward, A. B., & McLellan, J. S. (2017). Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(35), E7348–E7357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1707304114>
- Pan, X., Zhou, P., Fan, T., Wu, Y., Zhang, J., Shi, X., Shang, W., Fang, L., Jiang, X., Shi, J., Sun, Y., Zhao, S., Gong, R., Chen, Z., & Xiao, G. (2020). Immunoglobulin fragment F(ab')<sub>2</sub> against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*, *182*, 104868. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104868>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Perera, R. A. P. M., Ko, R., Tsang, O. T. Y., Hui, D. S. C., Kwan, M. Y. M., Brackman, C. J., To, E. M. W., Yen, H., Leung, K., Cheng, S. M. S., Chan, K. H., Chan, K. C. K., Li, K.-C., Saif, L., Barrs, V. R., Wu, J. T., Sit, T. H. C., Poon, L. L. M., & Peiris, M. (2021). Evaluation of a SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization

Test for Detection of Antibody in Human, Canine, Cat, and Hamster Sera. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(2). <https://doi.org/10.1128/JCM.02504-20>

- Pérez-Then, E., Lucas, C., Monteiro, V. S., Miric, M., Brache, V., Cochon, L., Vogels, C. B. F., Malik, A. A., De la Cruz, E., Jorge, A., De los Santos, M., Leon, P., Breban, M. I., Billig, K., Yildirim, I., Pearson, C., Downing, R., Gagnon, E., Muyombwe, A., ... Iwasaki, A. (2022). Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination. *Nature Medicine*, 28(3), 481–485. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01705-6>
- Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., Silacci-Fregni, C., Pinto, D., Rosen, L. E., Bowen, J. E., Acton, O. J., Jaconi, S., Guarino, B., Minola, A., Zatta, F., Sprugasci, N., Bassi, J., Peter, A., De Marco, A., ... Velesler, D. (2020). Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, 183(4), 1024–1042.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
- Pieri, M., Infantino, M., Manfredi, M., Nuccetelli, M., Grossi, V., Lari, B., Tomassetti, F., Sarubbi, S., Russo, E., Amedei, A., Benucci, M., Casprini, P., Stacchini, L., Castilletti, C., & Bernardini, S. (2022). Performance evaluation of four surrogate Virus Neutralization Tests (sVNTs) in comparison to the in vivo gold standard test. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 27(2). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2702074>
- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S., & Montefiori, D. C. (1997). Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary Infection and Long-Term-Nonprogressive Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(4), 924–932. <https://doi.org/10.1086/516508>
- Planas, D., Bruel, T., Grzelak, L., Guivel-Benhassine, F., Staropoli, I., Porrot, F., Planchais, C., Buchrieser, J., Rajah, M. M., Bishop, E., Albert, M., Donati, F., Prot, M., Behillil, S., Enouf, V., Maquart, M., Smati-Lafarge, M., Varon, E., Schortgen, F., ... Schwartz, O. (2021). Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nature Medicine*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>
- Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M. M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., Le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., ... Schwartz, O. (2021). Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 596(7871), 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
- Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., Lokugamage, K. G., Zhang, X., Muruato, A. E., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., Mirchandani, D., Scharton, D., Bilello, J. P., Ku, Z., An, Z., Kalveram, B., Freiberg, A. N., Menachery, V. D., Xie, X., ... Shi, P.-Y. (2021). Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, 592(7852), 116–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>

- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Kennedy, R. B. (2020). SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. In *The Lancet* (Vol. 396, Issue 10262, pp. 1595–1606). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32137-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32137-1)
- Prete, C. A., Buss, L. F., Buccheri, R., Abraham, C. M. M., Salomon, T., Crispim, M. A. E., Oikawa, M. K., Grebe, E., da Costa, A. G., Fraiji, N. A., do P. S. S. Carvalho, M., Whittaker, C., Alexander, N., Faria, N. R., Dye, C., Nascimento, V. H., Busch, M. P., & Sabino, E. C. (2022). Reinfection by the SARS-CoV-2 Gamma variant in blood donors in Manaus, Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07094-y>
- Prévost, J., Richard, J., Gasser, R., Ding, S., Fage, C., Anand, S. P., Adam, D., Gupta Vergara, N., Tauzin, A., Benlarbi, M., Gong, S. Y., Goyette, G., Privé, A., Moreira, S., Charest, H., Roger, M., Mothes, W., Pazgier, M., Brochiero, E., ... Finzi, A. (2021). Impact of temperature on the affinity of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein for host ACE2. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4), 101151. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101151>
- Prieto, J., Rammauro, F., López, M., Rey, R., Fernández, A., Bianchi, S., Gerona, S., Medina, J., & Pritsch, O. (2022). Low Immunoglobulin G Antibody Levels Against Severe Acute Respiratory Disease Coronavirus 2 After 2-Dose Vaccination Among Liver Transplantation Recipients. *Liver Transplantation*, 28(5), 891–894. <https://doi.org/10.1002/LT.26400>
- Ramanathan, M., Ferguson, I. D., Miao, W., & Khavari, P. A. (2021). SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *BioRxiv*, 2021.02.22.432359. <https://doi.org/10.1101/2021.02.22.432359>
- Rammauro, F. (2023). *Abordaje sistémico de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el SARS-COV-2* [Tesis de Doctorado, Universidad de la República Uruguay]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/42128>
- Rammauro, F., Carrión, F., Olivero-Deibe, N., Fló, M., Ferreira, A., Pritsch, O., & Bianchi, S. (2022). Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2. *Vaccine*, 40(35), 5189–5196. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.023>
- Rattanapisit, K., Shanmugaraj, B., Manopwisedjaroen, S., Purwono, P. B., Siri wattananon, K., Khorattanakulchai, N., Hanittinan, O., Boonyayothin, W., Thitithanyanont, A., Smith, D. R., & Phoolcharoen, W. (2020). Rapid production of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) and spike

- specific monoclonal antibody CR3022 in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, *10*(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74904-1>
- Risitano, A. M., Mastellos, D. C., Huber-Lang, M., Yancopoulou, D., Garlanda, C., Ciceri, F., & Lambris, J. D. (2020). Complement as a target in COVID-19? In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 343–344). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0320-7>
- Rivera, B., Leyva, A., Portela, M. M., Moratorio, G., Moreno, P., Durán, R., & Lima, A. (2020). Quantitative proteomic dataset from oro- and naso-pharyngeal swabs used for COVID-19 diagnosis: Detection of viral proteins and host's biological processes altered by the infection. *Data in Brief*, *32*, 106121.  
<https://doi.org/10.1016/J.DIB.2020.106121>
- Rossello, J., Lima, A., Gil, M., Rodríguez Duarte, J., Correa, A., Carvalho, P. C., Kierbel, A., & Durán, R. (2017). The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Scientific Reports*, *7*(1), 10281. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09926-3>
- Sadarangani, M., Marchant, A., & Kollmann, T. R. (2021). Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nature Reviews Immunology*, *21*(8), 475–484.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-021-00578-z>
- Saini, S. S., Allore, B., Jacobs, R. M., & Kaushik, A. (1999). Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. *European Journal of Immunology*, *29*(8), 2420–2426. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199908\)29:08<2420::AID-IMMU2420>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2420::AID-IMMU2420>3.0.CO;2-A)
- Saini, S. S., Farrugia, W., Ramsland, P. A., & Kaushik, A. K. (2003). Bovine IgM antibodies with exceptionally long complementarity-determining region 3 of the heavy chain share unique structural properties conferring restricted VH + Vλ pairings. *International Immunology*, *15*(7), 845–853. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg083>
- Salamanna, F., Maglio, M., Landini, M. P., & Fini, M. (2020). Body Localization of ACE-2: On the Trail of the Keyhole of SARS-CoV-2. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 7, p. 594495). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2020.594495>
- Sanda, M., Morrison, L., & Goldman, R. (2021). N- and O-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Analytical Chemistry*, *93*(4), 2003–2009. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03173>
- Santos, M. D. M., Lima, D. B., Fischer, J. S. G., Clasen, M. A., Kurt, L. U., Camillo-Andrade, A. C., Monteiro, L. C., de Aquino, P. F., Neves-Ferreira, A. G. C., Valente, R. H., Trugilho, M. R. O., Brunoro, G. V. F., Souza, T. A. C. B., Santos, R. M., Batista, M., Gozzo, F. C., Durán, R., Yates, J. R., Barbosa, V. C., & Carvalho, P. C. (2022). Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nature Protocols* *2022 17:7*, *17*(7), 1553–1578. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00690-x>

- Saultier, P., Ninove, L., Szepetowski, S., Veneziano, M., Visentin, S., Barlogis, V., Saba Villarroel, P. M., Amroun, A., Loosveld, M., de Lamballerie, X., & Chambost, H. (2022). Monoclonal antibodies for the treatment of COVID-19 in a patient with high-risk acute leukaemia. *British Journal of Haematology*, *196*(1), e1–e3. <https://doi.org/10.1111/BJH.17756>
- Schasfoort, R. B. M., van Weperen, J., van Amsterdam, M., Parisot, J., Hendriks, J., Koerselman, M., Karperien, M., Mentink, A., Bennink, M., Krabbe, H., Terstappen, L. W., & Mulder, A. H. L. (2021). High throughput surface plasmon resonance imaging method for clinical detection of presence and strength of binding of IgM, IgG and IgA antibodies against SARS-CoV-2 during CoViD-19 infection. *MethodsX*, *8*, 101432. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101432>
- Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H. H., Michailidis, E., Lorenzi, J. C. C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Caskey, M., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., Rice, C. M., ... Bieniasz, P. D. (2020). Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(11). <https://doi.org/10.1084/JEM.20201181>
- Schoof, M., Faust, B., Saunders, R. A., Sangwan, S., Rezelj, V., Hoppe, N., Boone, M., Billesbølle, C. B., Puchades, C., Azumaya, C. M., Kratochvil, H. T., Zimanyi, M., Deshpande, I., Liang, J., Dickinson, S., Nguyen, H. C., Chio, C. M., Merz, G. E., Thompson, M. C., ... Manglik, A. (2021). An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*, *370*(6523), 1473–1479. <https://doi.org/10.1126/science.abe3255>
- Schultz, N. H., Sørvoll, I. H., Michelsen, A. E., Munthe, L. A., Lund-Johansen, F., Ahlen, M. T., Wiedmann, M., Aamodt, A.-H., Skattør, T. H., Tjønnfjord, G. E., & Holme, P. A. (2021). Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*, *384*(22), 2124–2130. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2104882>
- Scudellari, M. (2020). How the pandemic might play out in 2021 and beyond. *Nature*, *584*(7819), 22–25. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02278-5>
- Seija, M., García-Luna, J., Rammauro, F., Brugnini, A., Trías, N., Astesiano, R., Santiago, J., Orihuela, N., Zulberti, C., Machado, D., Recalde, C., Yandián, F., Guerisoli, A., Noboa, J., Orihuela, S., Curi, L., Bugstaller, E., Noboa, O., Nin, M., ... Lens, D. (2023). Low switched memory B cells are associated with no humoral response after SARS-CoV-2 vaccine boosters in kidney transplant recipients. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1202630>
- Seija, M., Rammauro, F., Noboa, J., Santiago, J., Orihuela, N., Zulberti, C., Machado, D., Recalde, C., Astesiano, R., Yandián, F., Frantchez, V., Guerisoli, A., Morra, Á., Cassinelli, D., Coelho, C., de Aramburu, B., González-Severgnini, P., Moreno, R., Pippolo, A., ... Bianchi, S. (2022). Humoral Response to Heterologous SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Patients Is Heterogeneous and Dose Dependent. *Kidney International Reports*, *7*(8), 1887–1892. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.05.005>

- Seija, M., Rammauro, F., Santiago, J., Orihuela, N., Zulberti, C., Machado, D., Recalde, C., Noboa, J., Frantchez, V., Astesiano, R., Yandián, F., Guerisoli, A., Morra, Á., Cassinelli, D., Coelho, C., de Aramburu, B., González-Severgnini, P., Moreno, R., Pippolo, A., ... Bianchi, S. (2022). Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant. *Clinical Kidney Journal*, *15*(3), 527–533. <https://doi.org/10.1093/CKJ/SFAB291>
- Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., & Azadi, P. (2020). Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, *30*(12), 981–988. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>
- Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Abdullah AL-maskri, A. A., Kang, Y., Zeng, S., & Cai, S. (2020). Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(2), 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
- Shi, Y., Zeida, A., Edwards, C. E., Mallory, M. L., Sastre, S., Machado, M. R., Pickles, R. J., Fu, L., Liu, K., Yang, J., Baric, R. S., Boucher, R. C., Radi, R., & Carroll, K. S. (2022). Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2120419119>
- Shrock, E., Fujimura, E., Kula, T., Timms, R. T., Lee, I.-H., Leng, Y., Robinson, M. L., Sie, B. M., Li, M. Z., Chen, Y., Logue, J., Zuiani, A., McCulloch, D., Lelis, F. J. N., Henson, S., Monaco, D. R., Travers, M., Habibi, S., Clarke, W. A., ... Wong, C. (2020). Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science*, *370*(6520). <https://doi.org/10.1126/science.abd4250>
- Singh, P., Ghatak, S., Kumar, P., & Mehta, N. (2023). Potential role of hyperimmune milk as a source of passive immunotherapy against COVID-19: A review. *International Dairy Journal*, *147*, 105765. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105765>
- Sok, D., Le, K. M., Vadnais, M., Saye-Francisco, K. L., Jardine, J. G., Torres, J. L., Berndsen, Z. T., Kong, L., Stanfield, R., Ruiz, J., Ramos, A., Liang, C. H., Chen, P. L., Criscitiello, M. F., Mwangi, W., Wilson, I. A., Ward, A. B., Smider, V. V., & Burton, D. R. (2017). Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows. *Nature*, *548*(7665), 108–111. <https://doi.org/10.1038/nature23301>
- Sokolowska, M., Lukasik, Z. M., Agache, I., Akdis, C. A., Akdis, D., Akdis, M., Barcik, W., Brough, H. A., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Eyerich, S., Feleszko, W., Gomez-Casado, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Janda, J., Jiménez-Saiz, R., Jutel, M., Knol, E. F., Kortekaas Krohn, I., ... Untersmayr, E. (2020). Immunology of COVID-19: Mechanisms, clinical outcome, diagnostics, and perspectives—A report of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Allergy*, *75*(10), 2445–2476. <https://doi.org/10.1111/all.14462>

- Stanfield, R. L., Berndsen, Z. T., Huang, R., Sok, D., Warner, G., Torres, J. L., Burton, D. R., Ward, A. B., Wilson, I. A., & Smider, V. V. (2020). Structural basis of broad HIV neutralization by a vaccine-induced cow antibody. *Science Advances*, *6*(22). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0468>
- Stanfield, R. L., Haakenson, J., Deiss, T. C., Criscitiello, M. F., Wilson, I. A., & Smider, V. V. (2018). The Unusual Genetics and Biochemistry of Bovine Immunoglobulins. In *Advances in Immunology* (Vol. 137, pp. 135–164). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.12.004>
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Addetia, A., Hannon, W. W., Choudhary, M. C., Dings, A. S., Li, J. Z., & Bloom, J. D. (2020). Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. *BioRxiv*, 2020.11.30.405472. <https://doi.org/10.1101/2020.11.30.405472>
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K., Ellis, D., Crawford, K. H. D., Dings, A. S., Navarro, M. J., Bowen, J. E., Tortorici, M. A., Walls, A. C., King, N. P., Velesler, D., & Bloom, J. D. (2020). Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*, *182*(5), 1295-1310.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>
- Struble, L. R., Smith, A. L., Lutz, W. E., Grubbs, G., Sagar, S., Bayles, K. W., Radhakrishnan, P., Khurana, S., El-Gamal, D., & Borgstahl, G. E. O. (2022). Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Science*, *31*(5). <https://doi.org/10.1002/pro.4300>
- Sun, Z., Ren, K., Zhang, X., Chen, J., Jiang, Z., Jiang, J., Ji, F., Ouyang, X., & Li, L. (2020). Mass Spectrometry Analysis of Newly Emerging Coronavirus HCoV-19 Spike Protein and Human ACE2 Reveals Camouflaging Glycans and Unique Post-Translational Modifications. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.07.014>
- Svilenov, H. L., Sacherl, J., Protzer, U., Zacharias, M., & Buchner, J. (2021). Mechanistic principles of an ultra-long bovine CDR reveal strategies for antibody design. *Nature Communications* *2021* *12*:1, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27103-z>
- Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I. C., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C. W., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y. J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., & Wang, L. F. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology*, *38*(9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
- Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 58, Issue 6). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
- Tauzin, A., Nayrac, M., Benlarbi, M., Gong, S. Y., Gasser, R., Beaudoin-Bussi eres, G., Brassard, N., Laumaea, A., V ezina, D., Pr evost, J., Anand, S. P., Bourassa, C., Gendron-Lepage, G., Medjahed, H., Goyette, G., Niessl, J., Tastet, O., Gokool, L., Morrisseau, C., ... Finzi, A. (2021). A single dose of the

SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1137-1150.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.001>

Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., ... de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>

Tenforde, M. W., Patel, M. M., Ginde, A. A., Douin, D. J., Talbot, H. K., Casey, J. D., Mohr, N. M., Zepeski, A., Gaglani, M., McNeal, T., Ghamande, S., Shapiro, N. I., Gibbs, K. W., Files, D. C., Hager, D. N., Shehu, A., Prekker, M. E., Erickson, H. L., Exline, M. C., ... Self, W. H. (2022). Effectiveness of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Messenger RNA Vaccines for Preventing Coronavirus Disease 2019 Hospitalizations in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 74(9), 1515–1524. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab687>

Thomas, S. J., Moreira, E. D., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Polack, F. P., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Xu, X., Roychoudhury, S., Koury, K., Bouguermouh, S., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., ... Jansen, K. U. (2021). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *New England Journal of Medicine*, 385(19), 1761–1773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110345>

Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., Dong, X., & Zheng, P. (2021). N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.69091>

Tomé-Poderti, L., Olivero-Deibe, N., Carrión, F., Portela, M. M., Obal, G., Cabrera, G., Bianchi, S., Lima, A., Addiego, A., Durán, R., Moratorio, G., & Pritsch, O. (2024). Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein. *Scientific Reports*, 14(1), 12190. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62811-8>

Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, p. 420). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>

Trypsteen, W., Van Cleemput, J., Snippenberg, W. van, Gerlo, S., & Vandekerckhove, L. (2020). On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1009037. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009037>

Ulfman, L. H., Leusen, J. H. W., Savelkoul, H. F. J., Warner, J. O., & van Neerven, R. J. J. (2018). Effects of Bovine Immunoglobulins on Immune Function, Allergy, and Infection. *Frontiers in Nutrition*, 5, 52. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00052>

- Uriu, K., Kimura, I., Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Nakada, T., Kaneda, A., Nakagawa, S., & Sato, K. (2021). Neutralization of the SARS-CoV-2 Mu Variant by Convalescent and Vaccine Serum. *New England Journal of Medicine*, 385(25), 2397–2399. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2114706>
- U.S. Food & Drug Administration. (2022, April 14). *In Vitro Diagnostics EUAs - Serology and Other Adaptive Immune Response Tests for SARS-CoV-2 | FDA*. Medical Devices/ Coronavirus. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-serology-and-other-adaptive-immune-response-tests-sars-cov-2>
- U.S. Food and Drug Administration. (2020). *FDA Approves First Treatment for Ebola Virus*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>
- Valcourt, E. J., Manguiat, K., Robinson, A., Chen, J. C. Y., Dimitrova, K., Philipson, C., Lamoureux, L., McLachlan, E., Schiffman, Z., Drebot, M. A., & Wood, H. (2021). Evaluation of a commercially-available surrogate virus neutralization test for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 99(4). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115294>
- van Kasteren, P. B., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., de Jonge, J., van den Brandt, A., Molenkamp, R., Reusken, C. B. E. M., & Meijer, A. (2020). Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104412. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104412>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 155–170). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Voysey, M., Clemens, S. A. C., Madhi, S. A., Weckx, L. Y., Folegatti, P. M., Aley, P. K., Angus, B., Baillie, V. L., Barnabas, S. L., Bhorat, Q. E., Bibi, S., Briner, C., Cicconi, P., Collins, A. M., Colin-Jones, R., Cutland, C. L., Darton, T. C., Dheda, K., Duncan, C. J. A., ... Zuidewind, P. (2021). Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet*, 397(10269), 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
- Walker, S. N., Chokkalingam, N., Reuschel, E. L., Purwar, M., Xu, Z., Gary, E. N., Kim, K. Y., Helble, M., Schultheis, K., Walters, J., Ramos, S., Muthumani, K., Smith, T. R. F., Broderick, K. E., Tebas, P., Patel, A., Weiner, D. B., & Kulp, D. W. (2020). SARS-CoV-2 Assays to Detect Functional Antibody Responses That Block ACE2 Recognition in Vaccinated Animals and Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(11). <https://doi.org/10.1128/JCM.01533-20>

- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch, B. J., Rey, F. A., & Veesler, D. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(42), 11157–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
- Wang, F., Ekiert, D. C., Ahmad, I., Yu, W., Zhang, Y., Bazirgan, O., Torkamani, A., Raudsepp, T., Mwangi, W., Criscitiello, M. F., Wilson, I. A., Schultz, P. G., & Smider, V. V. (2013). Reshaping antibody diversity. *Cell*, *153*(6), 1379–1393. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.049>
- Wang, N., Shang, J., Jiang, S., & Du, L. (2020). Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00298>
- Wang, P., Nair, M. S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Chang, J. Y., Yin, M. T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C. A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., & Ho, D. D. (2021). Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, *181*(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
- Wang, T. T. (2019). *IgG Fc Glycosylation in Human Immunity* (pp. 63–75). [https://doi.org/10.1007/82\\_2019\\_152](https://doi.org/10.1007/82_2019_152)
- Wang, Z., Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Barnes, C. O., Finkin, S., Schaefer-Babajew, D., Cipolla, M., Gaebler, C., Lieberman, J. A., Oliveira, T. Y., Yang, Z., Abernathy, M. E., Huey-Tubman, K. E., Hurley, A., Turroja, M., West, K. A., Gordon, K., Millard, K. G., ... Nussenzweig, M. C. (2021). mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03324-6>
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, *369*(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Weber, F. (2020). Antiviral Innate Immunity: Introduction. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21290-9>
- Weinbergerová, B., Demel, I., Víšek, B., Válka, J., Čerňan, M., Jindra, P., Novák, J., Stejskal, L., Kováčsová, F., Kabut, T., Sztokowski, T., Hájek, R., Žák, P., Cetkovský, P., Král, Z., & Mayer, J. (2022). Successful early use of anti-SARS-CoV-2 monoclonal neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 infected

- hematological patients – A Czech multicenter experience. *Hematological Oncology*, 40(2), 280–286. <https://doi.org/10.1002/HON.2974>
- Wilder-Smith, A., & Mulholland, K. (2021). Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 385(10), 946–948. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2111165>
- Williams, J. A., Biancucci, M., Lessen, L., Tian, S., Balsaraf, A., Chen, L., Chesterman, C., Maruggi, G., Vandepaer, S., Huang, Y., Mallett, C. P., Steff, A.-M., Bottomley, M. J., Malito, E., Wahome, N., & Harshbarger, W. D. (2023). Structural and computational design of a SARS-CoV-2 spike antigen with improved expression and immunogenicity. *Science Advances*, 9(23). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg0330>
- World Health Organization. (2020a). *General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19–11 March 2020*. World Health Organization. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization. (2020b). *IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV)*. Geneva, Switzerland. [https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihc-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihc-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov))
- World Health Organization. (2020c). Who statement regarding cluster of pneumonia cases in wuhan, China. In *Who.Int*.
- World Health Organization. (2023, March 30). *COVID-19 vaccine tracker and landscape*. COVID-19 - Landscape of Novel Coronavirus Candidate Vaccine Development Worldwide. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wyllie, D., Mulchandani, R., Jones, H. E., Taylor-Phillips, S., Brooks, T., Charlett, A., Ades, A. E., Makin, A., Oliver, I., Moore, P., Boyes, J., Hormis, A., Todd, N., & Reckless, I. (2020). SARS-CoV-2 responsive T cell numbers are associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. In *medRxiv* (p. 2020.11.02.20222778). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.11.02.20222778>

- Yamin, R., Jones, A. T., Hoffmann, H.-H., Schäfer, A., Kao, K. S., Francis, R. L., Sheahan, T. P., Baric, R. S., Rice, C. M., Ravetch, J. V., & Bournazos, S. (2021). Fc-engineered antibody therapeutics with improved anti-SARS-CoV-2 efficacy. *Nature*, *599*(7885), 465–470. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04017-w>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, *367*(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- Yanakieva, D., Vollmer, L., Evers, A., Siegmund, V., Arras, P., Pekar, L., Doerner, A., Valldorf, B., Kolmar, H., Zielonka, S., & Krahl, S. (2023). Cattle-derived knob paratopes grafted onto peripheral loops of the IgG1 Fc region enable the generation of a novel symmetric bispecific antibody format. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1238313>
- Yang, J., Wang, W., Chen, Z., Lu, S., Yang, F., Bi, Z., Bao, L., Mo, F., Li, X., Huang, Y., Hong, W., Yang, Y., Zhao, Y., Ye, F., Lin, S., Deng, W., Chen, H., Lei, H., Zhang, Z., ... Wei, X. (2020). A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*, *586*(7830), 572–577. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>
- Yang, Q., Hughes, T. A., Kelkar, A., Yu, X., Cheng, K., Park, S. J., Huang, W. C., Lovell, J. F., & Neelamegham, S. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N-and O-glycan elaboration. *ELife*, *9*, 1–44. <https://doi.org/10.7554/eLife.61552>
- Yi, C., Ling, Z., Lu, X., Fu, Y., Yang, Z., Wangmo, S., Chen, S., Zhang, Y., Ma, L., Gu, W., Lu, H., Sun, X., & Sun, B. (2022). A SARS-CoV-2 antibody retains potent neutralization against Omicron by targeting conserved RBM residues. *Cellular & Molecular Immunology*, *19*(5), 647–649. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00853-6>
- Yi, C., Sun, X., Ye, J., Ding, L., Liu, M., Yang, Z., Lu, X., Zhang, Y., Ma, L., Gu, W., Qu, A., Xu, J., Shi, Z., Ling, Z., & Sun, B. (2020). Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cellular and Molecular Immunology*, *17*(6), 621–630. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0458-z>
- Younes, S., Al-Jighefee, H., Shurrab, F., Al-Sadeq, D. W., Younes, N., Dargham, S. R., Al-Dewik, N., Qotba, H., Syed, M., Alnuaimi, A., Yassine, H. M., Tang, P., Abu-Raddad, L. J., & Nasrallah, G. K. (2021). Diagnostic efficiency of three fully automated serology assays and their correlation with a novel surrogate virus neutralization test in symptomatic and asymptomatic SARS-COV-2 individuals. *Microorganisms*, *9*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020245>
- Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., & Lennon-Duménil, A.-M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature Reviews Immunology*, *13*(7), 475–486. <https://doi.org/10.1038/nri3469>

- Zhang, G., Pomplun, S., Loftis, A. R. (, Loas, A., & Pentelute, B. L. (2020). The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein. *BioRxiv*, 2020.03.19.999318. <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318>
- Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B. D., Rangarajan, E. S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M. S., Li, W., Izard, T., Rader, C., Farzan, M., & Choe, H. (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications*, 11(1), 6013. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19808-4>
- Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., Li, C., Hu, Y., Chu, K., Han, W., Chen, Z., Tang, R., Yin, W., Chen, X., Hu, Y., Liu, X., Jiang, C., Li, J., Yang, M., Song, Y., Wang, X., Gao, Q., & Zhu, F. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
- Zhao, P., Praissman, J. L., Grant, O. C., Cai, Y., Xiao, T., Rosenbalm, K. E., Aoki, K., Kellman, B. P., Bridger, R., Barouch, D. H., Brindley, M. A., Lewis, N. E., Tiemeyer, M., Chen, B., Woods, R. J., & Wells, L. (2020). Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host & Microbe*, 28(4), 586–601.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.004>
- Zheng, Y., Zhuang, M. W., Han, L., Zhang, J., Nan, M. L., Zhan, P., Kang, D., Liu, X., Gao, C., & Wang, P. H. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00438-7>
- Zhou, D., Duyvesteyn, H. M. E., Chen, C. P., Huang, C. G., Chen, T. H., Shih, S. R., Lin, Y. C., Cheng, C. Y., Cheng, S. H., Huang, Y. C., Lin, T. Y., Ma, C., Huo, J., Carrique, L., Malinauskas, T., Ruza, R. R., Shah, P. N. M., Tan, T. K., Rijal, P., ... Huang, K. Y. A. (2020). Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(10), 950–958. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0480-y>
- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, T., & Xu, K. (2018). *Structural Features of Broadly Neutralizing Antibodies and Rational Design of Vaccine* (pp. 73–95). [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0484-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0484-2_4)
- Zoufaly, A., Poglitsch, M., Aberle, J. H., Hoepler, W., Seitz, T., Traugott, M., Grieb, A., Pawelka, E., Laferl, H., Wenisch, C., Neuhold, S., Haider, D., Stiasny, K., Bergthaler, A., Puchhammer-Stoeckl, E., Mirazimi, A., Montserrat, N., Zhang, H., Slutsky, A. S., & Penninger, J. M. (2020). Human

recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(11), 1154–1158.  
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30418-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30418-5)

Zylberman, V., Sanguineti, S., Pontoriero, A. V., Higa, S. V., Cerutti, M. L., Morrone Seijo, S. M., Pardo, R., Muñoz, L., Acuña Intriari, M. E., Alzogaray, V. A., Avaro, M. M., Benedetti, E., Berguer, P. M., Bocanera, L., Bukata, L., Bustelo, M. S., Campos, A. M., Colonna, M., Correa, E., ... Goldbaum, F. A. (2020). Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina. *Medicina*, 80 Suppl 3, 1–6.

# AGRADECIMIENTOS

---

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a las personas e instituciones que colaboraron para que este trabajo llegue a su fin, pero también a aquellos que desde un costado menos académico han tenido un rol igualmente protagónico, haciendo que las cosas sean un poco mejor a pesar de las adversidades.

A Otto, por darme la oportunidad, la motivación y la confianza; siempre riguroso desde el punto de vista científico, pero sin ocultar su costado más humano.

A Sergio, por su amistad, su serenidad y calidez, asumiendo el rol de “*timonel*” aun cuando la tormenta arreciaba y era igual de cruel con todos. Trabajó denodadamente en este proyecto “desde el día antes de empezar” otorgándome en silencio todas las garantías a la hora de buscar un nuevo director para este trabajo.

A los integrantes de la Comisión de Admisión y Seguimiento y del Tribunal de Tesis: María Moreno, Mabel Berois, Alejandro Buschiazzi y Marcelo Hill, por su predisposición y buena voluntad para acceder a mis casi siempre “urgentes” pedidos.

A Florencia, Natalia y Martín, por permitir mantenernos a flote, por el apoyo incondicional y las horas de trabajo compartido.

A Madelón, Analía y Rosario, por su colaboración incondicional, paciencia y capacidad de interpretar nuestras necesidades.

A Claudia, Ceci y el Colo, que fueron potentes catalizadores de este trabajo, siempre comprometidos y buscando sumar desde diferentes ángulos.

A Pili y el Mora, referentes en la temática, siempre listos para echar una mano.

A Ana María Ferreira y Florencia Irigoín, presentes desde el inicio.

A la Dirección del Institut Pasteur de Montevideo y todo su *staff*, que de alguna manera colaboraron a lo largo de estos años de pandemia, haciendo que las cosas sucedieran: el personal científico (investigadores,

técnicos y estudiantes) y las múltiples áreas de apoyo con su trabajo de hormiga (intendencia, preparación de materiales, compras y finanzas, programas y proyectos, innovación y valorización, coordinación académica, informática, comunicación, secretaría, capital humano, etc.). En especial a Hugo Naya, Marcelo Comini, Sergio Pantano, Andrés Abín, Luis Inchausti, Virginia Gorrostorrazo, Macarena Sarroca, Guillermo González y Victoria Fernández.

A la Universidad de la República y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar parte de la fabricación de kits serológicos y un proyecto FMV vinculado a esta tesis.

Al Fondo de Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM) por financiar el desarrollo de kits serológicos y la compra de equipos e insumos.

Al Grupo de Trabajo Interinstitucional para el desarrollo de ensayos serológicos contra el SARS-CoV-2 (GTI-Serología).

A las empresas ATGen S.R.L. y Laboratorios Microsules, Uruguay.

A *“los ñoños”* que con sus *“Whatsapps de larga tirada”* fueron durante la pandemia una fuente inagotable de información, puntos de vista y contacto con la realidad.

A Lore, omnipresente y culpable de que la *“llamita”* no se haya apagado jamás.

A mis viejos, eternos responsables de que sea *“un afortunado”*.

A Maca, mi *“cómplice y todo”* en esta aventura de ser feliz.

# ANEXO

## 1. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla Suplementaria 1

**Supplementary Table 1: LC-MS/MS analysis of RBD<sup>ch</sup>-IEX fractions.** Summary of sequence coverage achieved with reduced/alkylated RBD<sup>ch</sup>-IEX fractions. Modifications allowed in this search were cysteine carbamidomethylation [+57.02146 Da] as fixed parameter and methionine oxidation [+15.9949 Da] as variable parameters. Identified amino acids are depicted in blue and those that remained non-identified are represented in red. Each fraction is accompanied by the percentage of sequence coverage and the number of spectra obtained with each sample. A summary of search parameters is depicted below the table.

**IEX a 92.3% (216/234) 3963 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

**IEX b 91.0% (213/234) 3405 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

**IEX c 91.0% (213/234) 3910 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

**IEX d 91.0% (213/234) 5227 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

**IEX e 90.6% (212/234) 2919 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

**IEX f 90.6% (212/234) 3932 spectra**

317 RSRVQPTESI VRFPNITNLC PFGEVFNATR FASVYAWNRR RISNCVADYS VLYNSASFST 376  
 377 FKCYGVSPTK LNDLCFTNVY ADSFVIRGDE VRQIAPGQTG KIADYNYKLP DDFTGCVIAW 436  
 437 NSNNLDSKVG GNYNYLYRLF RKS NLKPFER DISTEIQAG STPCNGVEGF NCFYFLQSYG 496  
 497 FQPTNGVGYQ PYRVVLSFE LLHAPATVCG PKKSTNLVKN KCVNFGPFED DDDK 550

# comet\_version 2021.01 rev. 0

Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerancefor search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949)

Fix modifications: Cys carbamidomethylation (+57.0215)

Database: Drosophila melanogasters sequences downloaded from Uniprot (june 2020) +RBD<sup>ch</sup> sequence + common

proteomics contaminants (target -reverse)

PTMs filtered FDR<1% at the protein level

Tabla Suplementaria 2

**Supplementary Table 2: LC-MS/MS analysis of <sup>de</sup>RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions.** Summary of sequence coverage achieved with reduced/alkylated <sup>de</sup>RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions. Modifications allowed in this search were cysteine carbamidomethylation [+57.02146 Da] and asparagine deamidation [+0.9840 Da] as variable modifications. Identified amino acids are depicted in blue and those non-identified are depicted in red. Each fraction is accompanied by the percentage of sequence coverage and the number of spectra obtained with each sample. Numbers in brackets correspond to the modification associated additional mass (in Daltons). A summary of search parameters is depicted below the table.

**IEX a 98.3% (230/234) 3560 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

**IEX b 98.7% (231/234) 4902 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

**IEX c 98.7% (231/234) 5638 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

**IEX d 98.7% (231/234) 5483 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

**IEX e 98.3% (230/234) 3497 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

**IEX f 79.9% (187/234) 2103 spectra**

|     |            |            |             |            |            |            |     |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 317 | RSRVQPTESI | VRFPNITNLC | PFGEVFNATR  | FASVYAWNPK | RISNCVADYS | VLYNSASFST | 376 |
| 377 | FKCYGVSPK  | LNDLCFTNVY | ADSFVIRGDE  | VRQIAPGQTG | KIADYNYKLP | DDFTGCVIAW | 436 |
| 437 | NSNNLDSKVG | GNYNYLYRLF | RKSNLKPFFER | DISTEIQAG  | STPCNGVEGF | NCYFPLQSYG | 496 |
| 497 | FQPTNGVGYQ | PYRVVLSFE  | LLHAPATVCG  | PKKSTNLVKN | KCVNFGPFED | DDDK       | 550 |

# comet\_version 2021.01 rev. 0

Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerancefor search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modification: Asp/Gln deamidation (+ 0.9840 )

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949 )

Fix modification: Cys carbamidomethylation (+57.0215)

Database: Drosophila melanogasters sequences downloaded from Uniprot (june 2020) +RBD<sup>clv</sup> sequence + common proteomics contaminants (target -reverse)

PTMs filtered FDR<1% at the protein level

Tabla Suplementaria 3

**Supplementary Table 3: Identification of deamidations on the peptide containing N-glycosylation sequons in <sup>deg</sup>RBD<sup>div</sup> by LC-MS/MS.** List of scans identifying the peptide containing N-glycosylation sequons in reduced/alkylated <sup>deg</sup>RBD<sup>div</sup>-IEX fractions. Modifications allowed in this search were cysteine carbamidomethylation [+57.02146 Da], methionine oxidation [+15.9949 Da] and asparagine deamidation [+0.9840 Da], and Tris adducts on asparagine [+104.0712 Da] as variable modifications. Doubly deamidated peptides represented 91% of total scans (839/922 scans, in green), those exclusively deamidated in the first asparagine N<sub>331</sub> represented 0.2% of total scans (2/922 scans, in red) and those with a single deamidation on the second asparagine N<sub>343</sub> represented 8.8% (81/922 scans, in yellow). Numbers in brackets correspond to the variable modification associated additional mass (in Daltons). A summary of search parameters is depicted below the table.

| IEX FRACTION | PEPTIDE                                                      | SCAN COUNTS | DEAMIDATION POSITION               |
|--------------|--------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| a            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 76          | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| a            | FPNITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                          | 7           | N <sub>343</sub>                   |
| a            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 4           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| a            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 3           | N <sub>343</sub>                   |
| a            | FPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| b            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 251         | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| b            | FPNITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                          | 33          | N <sub>343</sub>                   |
| b            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 7           | N <sub>343</sub>                   |
| b            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 6           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| b            | FPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 3           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| b            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| b            | VQPTESIVRFPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 1           | N <sub>343</sub>                   |
| c            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 217         | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| c            | FPNITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                          | 7           | N <sub>343</sub>                   |
| c            | FPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 7           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| c            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 5           | N <sub>343</sub>                   |
| c            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 2           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| c            | VQPTESIVRFPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 1           | N <sub>343</sub>                   |
| c            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| d            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 188         | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| d            | FPNITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                          | 6           | N <sub>343</sub>                   |
| d            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 5           | N <sub>343</sub>                   |
| d            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 4           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| d            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFNATR                          | 2           | N <sub>331</sub>                   |
| d            | FPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 2           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| d            | FPN[0.9840]ITN[104.0712]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR        | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| d            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFNATR                          | 1           | N <sub>343</sub>                   |
| e            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 60          | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| e            | FPNITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                          | 3           | N <sub>343</sub>                   |
| e            | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 2           | N <sub>343</sub>                   |
| e            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 2           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| e            | FPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| f            | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                  | 10          | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| f            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR         | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |
| f            | VQPTESIVRFPN[0.9840]ITN[0.9840]LC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR | 1           | N <sub>331</sub> /N <sub>343</sub> |

# comet\_version 2021.01 rev. 0

Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerancefor search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modification: Asp/Gln deamidation (+ 0.9840 )

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949 )

Variable modifications: Cys carbamidomethylation (+57.0215)

Variable modifications: Asp Tris adduct (+ 104.071154)

Database: Drosophila melanogasters sequences downloaded from Uniprot (june 2020) +RDB<sup>div</sup> sequence + common proteomics contaminants (target - reverse)

PTMs filtered FDR<1% at the protein level

Tabla Suplementaria 4

**Supplementary Table 4: LC-MS/MS analysis of N-glycans on RBD<sup>clv</sup>.** List of scans identifying the N-glycopeptide of reduced/alkylated RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions, with different glycan moieties. Modifications allowed in this search were cysteine carbamidomethylation [+57.02146 Da] as fixed modifications and methionine oxidation [+15.9949 Da], asparagine N-glycosylations: M3 (Hex3HexNAc2, [+892.3173]); FM3 (dHexHex3HexNAc2, [+1038.3751]); M4 (Hex4HexNAc2, [+1054.3700]); M5 (Hex5HexNAc2, [+1216.4229]); M6 (Hex6HexNAc2, [+1378.4757]); M7 (Hex7HexNAc2, [+1540.5285]); and M8 (Hex8HexNAc2, [+1702.5813]) as variable modifications. Numbers in brackets correspond to the variable modification associated additional mass (in Daltons) while fixed modifications were not included for clarity. The structure of each identified N-glycosylation moiety is shown in simplified colored CFG representation with its Oxford notation name for clarity. A summary of search parameters is depicted below the table.

| IEX FRACTION | N-GLYCOPEPTIDE                 | SCAN COUNTS | GLYCAN |
|--------------|--------------------------------|-------------|--------|
| c            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 12          | M3     |
| d            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 11          |        |
| a            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 8           |        |
| e            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 7           |        |
| b            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 6           |        |
| f            | FPNITNLCPFGGEVFN[892.3172]ATR  | 6           |        |
| d            | FPNITNLCPFGGEVFN[1038.3751]ATR | 11          | FM3    |
| b            | FPNITNLCPFGGEVFN[1038.3751]ATR | 8           |        |
| e            | FPNITNLCPFGGEVFN[1038.3751]ATR | 6           |        |
| c            | FPNITNLCPFGGEVFN[1038.3751]ATR | 5           |        |
| b            | FPNITNLCPFGGEVFN[1054.3700]ATR | 3           | M4     |
| d            | FPNITNLCPFGGEVFN[1054.3700]ATR | 3           |        |
| a            | FPNITNLCPFGGEVFN[1054.3700]ATR | 2           |        |
| f            | FPNITNLCPFGGEVFN[1054.3700]ATR | 1           |        |
| c            | FPNITNLCPFGGEVFN[1054.3700]ATR | 1           |        |
| b            | FPNITNLCPFGGEVFN[1216.4229]ATR | 3           | M5     |
| d            | FPNITNLCPFGGEVFN[1216.4229]ATR | 3           |        |
| a            | FPNITNLCPFGGEVFN[1216.4229]ATR | 1           |        |

# comet\_version 2021.01 rev. 0

Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerancefor search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949 )

Variable modifications: Asp: Hex3HexNAc2 (+892.3173)

Variable modifications: Asp dHex Hex(3) HexNAc(2) (+1038.3751)

Variable modifications: Asp Hex(4) HexNAc(2) (+1054.3700)

Variable modifications: Asp Hex(5)HexNAc(2) (+1216.4229)

Variable modifications: Asp Hex(6)HexNAc(2) (+1378.4757)

Variable modifications: Asp Hex(7)HexNAc(2) (+1540.5285)

Variable modifications: Asp Hex(8)HexNAc(2) (+1702.5813)

Fix modifications: Cys carbamidomethylation (+57.0215)

Database: Drosophila melanogasters sequences downloaded from Uniprot (june 2020) +RBD<sup>clv</sup> sequence + common proteomics contaminants (target -reverse)

PTMs filtered FDR<1% at the protein level

Tabla Suplementaria 5

Supplementary Table 5: Identification of O-glycans in <sup>de6</sup>RBD<sup>de6</sup> by LC-MS/MS. List of O-glycosylated peptides identified in reduced/alkylated <sup>de6</sup>RBD<sup>de6</sup>. HEX fractions, with Cysteine carbamidomethylation [+57.02146], Asparagine/Glutamine deamidation [+0.9840], Methionine oxidation [+15.9949 Da] and Serine/Threonine O-glycosylation (HexNAc [+203.0794]; HexHexNAc, [+365.1321]) as variable modifications. Numbers in brackets correspond to modification associated additional mass (in Daltons). The structure of each identified O-glycosylation moiety is shown below in simplified colored CFG format for clarity. A summary of search parameters is depicted below the table.

| HEX FRACTION | O-GLYCAN   | PEPTIDE                                                                           | SCAN COUNTS |
|--------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| c            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 123         |
| b            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 84          |
| c            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 75          |
| c            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 72          |
| d            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 50          |
| d            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 48          |
| a            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 44          |
| a            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 40          |
| d            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 40          |
| b            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 37          |
| e            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 34          |
| e            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 30          |
| b            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 18          |
| e            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 13          |
| a            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 10          |
| f            | Tn         | FPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 6           |
| f            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 5           |
| b            | Tn         | FPNITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                             | 4           |
| c            | Tn         | FPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                     | 3           |
| c            | Core1      | VQ[0.9840]PTE SIVRFPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                   | 3           |
| d            | Tn         | FPNIT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                           | 3           |
| c            | Tn         | FPNIT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                           | 2           |
| c            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                             | 2           |
| c            | Core1      | VQ[0.9840]PT[365.1322]E[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR | 2           |
| c            | Core1      | FPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 2           |
| c            | Core1 y Tn | FPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 2           |
| b            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 2           |
| d            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                           | 2           |
| d            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                             | 2           |
| d            | Tn         | FPNIT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                             | 2           |
| d            | Tn         | SRVQPTESIVRFPN[0.9840]IT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR          | 1           |
| d            | Tn         | VQPTESIVRFPN[0.9840]IT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR            | 1           |
| d            | Tn         | VQPTESIVRFPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                            | 1           |
| d            | Tn         | VQPTESIVRFPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |
| c            | Tn         | FPNITNLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                             | 1           |
| c            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                           | 1           |
| b            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                     | 1           |
| b            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                             | 1           |
| b            | Tn         | FPNIT[203.0794]N[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                             | 1           |
| b            | Tn         | FPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                           | 1           |
| b            | Core1      | FPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                                     | 1           |
| d            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 1           |
| f            | Tn         | FPNIT[203.0794]NLC[57.0215]PFGVEFNAT[203.0794]R                                   | 1           |
| c            | Core1      | VQPT[365.1322]E SIVR                                                              | 9           |
| f            | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                             | 3           |
| d            | Core1 y Tn | LPDDFTGCVIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                           | 5           |
| d            | Core1      | VQPT[365.1322]E SIVR                                                              | 3           |
| b            | Tn         | LPDDFTGCVIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                           | 4           |
| b            | Core1      | VQPT[365.1322]E SIVR                                                              | 2           |
| d            | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                             | 2           |
| a            | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                             | 1           |
| c            | Core1      | VQPT[365.1322]E SIVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                   | 1           |
| c            | Core1      | VQPT[365.1322]E S[365.1322]IVRFPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR         | 1           |
| c            | Core1      | SRVQPT[365.1322]E SIVR                                                            | 1           |
| d            | Core1 y Tn | LPDDFTGCVIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                           | 3           |
| a            | Tn         | LPDDFTGCVIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                           | 3           |
| d            | Tn         | LPDDFTGC[57.0215]VIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                  | 3           |
| c            | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |
| c            | Core1      | VQPT[365.1322]E SIVR                                                              | 1           |
| c            | Core1      | VQPT[365.1322]E S[365.1322]IVRFPNITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                 | 1           |
| b            | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                             | 1           |
| c            | Core1 y Tn | LPDDFTGCVIAWNI[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK                           | 2           |
| b            | Core1      | ST[365.1322]N[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                           | 2           |
| b            | Core1      | S[365.1322]T[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                            | 2           |
| d            | Core1      | ST[365.1322]N[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                           | 2           |
| b            | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |
| d            | Core1      | SRVQPT[365.1322]E SIVR                                                            | 1           |
| d            | Core1      | VQ[0.9840]PTE S[365.1322]IVRFPNITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                   | 1           |
| d            | Core1      | VQPT[365.1322]E S[365.1322]IVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR         | 1           |
| d            | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPNITN[0.9840]LC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |
| d            | Core1      | VQPTESIVRFPN[0.9840]IT[365.1322]NLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |
| d            | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPN[0.9840]ITNLC[57.0215]PFGVEFN[0.9840]ATR                    | 1           |

## continuación Tabla Suplementaria 5

|   |            |                                                                            |    |
|---|------------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| d | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 1  |
| d | Core1      | S[365.1322]RVQ[0.9840]PTESIVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR          | 1  |
| e | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                      | 1  |
| e | Core1      | VQPT[365.1322]ESIVR                                                        | 1  |
| f | Core1      | S[365.1322]RVQPTESIVR                                                      | 1  |
| a | Core1      | VQPT[365.1322]ESIVRFPN[0.9840]IT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR            | 1  |
| d | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR         | 17 |
| c | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR         | 13 |
| c | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]N[0.9840]LCPFGVFN[0.9840]ATR   | 7  |
| d | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPN[0.9840]IT[365.1322]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR | 4  |
| c | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPN[0.9840]IT[365.1322]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR | 3  |
| d | Core1      | VQPT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]N[0.9840]LCPFGVFN[0.9840]ATR   | 3  |
| d | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPN[0.9840]IT[365.1322]NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR   | 2  |
| d | Core1      | VQPTES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR           | 2  |
| d | Core1      | VQ[0.9840]PT[365.1322]ES[365.1322]IVRFPNIT[365.1322]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR | 1  |
| c | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVR                                                        | 5  |
| c | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[N[0.9840]L[C[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR           | 4  |
| c | Tn         | SRVQPT[203.0794]ESIVR                                                      | 3  |
| c | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                    | 3  |
| d | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVR                                                        | 3  |
| d | Tn         | S[203.0794]RVQPTESIVR                                                      | 3  |
| c | Tn         | S[203.0794]RVQPTESIVR                                                      | 2  |
| f | Tn         | S[203.0794]RVQPTESIVR                                                      | 2  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                    | 1  |
| a | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVRFPN[0.9840]IT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR            | 1  |
| a | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVR                                                        | 1  |
| c | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR                    | 1  |
| c | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPN[0.9840]IT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR            | 1  |
| c | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[203.0794]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR                   | 1  |
| c | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVRFPNIT[N[0.9840]L[C[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR           | 1  |
| b | Tn         | S[203.0794]RVQPTESIVR                                                      | 1  |
| b | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVR                                                        | 1  |
| c | Core1 y Tn | Q[0.9840]VQ[0.9840]IT[203.0794]IVRFPN[0.9840]IT[365.1322]K[VIAWNSN]LDSK    | 1  |
| b | Core1 y Tn | Q[0.9840]VQ[0.9840]IT[365.1322]K[VIAWNSN]LDSK                              | 1  |
| a | Core1      | ST[365.1322]N[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                    | 1  |
| d | Core1      | S[365.1322]IT[N[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                  | 1  |
| e | Core1      | ST[365.1322]N[0.9840]LVKN[0.9840]KCVN[0.9840]FGPFEDDDDK                    | 1  |
| c | Tn         | LPDDFTGC[57.0215]VIAWN[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK            | 1  |
| b | Tn         | LPDDFTGC[57.0215]VIAWN[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK            | 1  |
| e | Tn         | LPDDFTGC[57.0215]VIAWN[0.9840]S[203.0794]N[0.9840]N[0.9840]LDSK            | 1  |
| d | Core1      | IS[365.1322]NCVADYSLVNSASFTFK                                              | 1  |
| b | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVRFPN[0.9840]IT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR            | 1  |
| b | Tn         | SRVQPT[203.0794]ESIVR                                                      | 1  |
| d | Tn         | SRVQPT[203.0794]ESIVR                                                      | 1  |
| d | Tn         | RSRVQPT[203.0794]ESIVR                                                     | 1  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[N[0.9840]L[C[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR           | 1  |
| e | Tn         | S[203.0794]RVQPTESIVR                                                      | 1  |
| f | Tn         | VQPT[203.0794]ESIVR                                                        | 1  |
| d | Tn         | VQ[0.9840]PT[203.0794]ES[203.0794]IVRFPN[0.9840]IT[NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR  | 1  |
| d | Tn         | VQ[0.9840]PT[203.0794]ES[203.0794]IVRFPNIT[NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR  | 1  |
| c | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[203.0794]N[0.9840]LCPFGVFN[0.9840]ATR             | 1  |
| c | Tn         | VQPTESIVRFPN[0.9840]IT[203.0794]N[0.9840]L[C[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR    | 1  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[203.0794]N[0.9840]LCPFGVFN[0.9840]ATR             | 1  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[203.0794]N[0.9840]L[C[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR  | 1  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPNIT[203.0794]NLC[PFGEVFN[0.9840]ATR                   | 1  |
| d | Tn         | VQPTES[203.0794]IVRFPN[0.9840]IT[203.0794]NLC[57.0215]PFGEVFN[0.9840]ATR   | 1  |



# comet\_version 2021.01 rev. 0

## Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerance for search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modification: Asp/Gln deamidation (+ 0.9840)

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949)

Variable modifications: Ser/Thr HexNac (+203.0794)

Variable modifications: Ser/Thr Hex(1)HexNac(1)(+365.1321)

Variable modification: Cys carbamidomethylation (+57.0215)

Database: Drosophila melanogaster sequences downloaded from Uniprot (june 2020) +RDB<sup>db</sup> sequence + common proteomics contaminants (target-reverse)

PTMs filtered FDR&lt;1% at the protein level

Tabla Suplementaria 6

**Supplementary Table 6: Identification of spontaneous deamidations in RBD<sup>Δ</sup>.** List of deamidated peptides identified in reduced/alkylated RBD<sup>Δ</sup>-IEX fractions by LC-MS/MS analysis. Modifications allowed in this search were Cysteine carbamidomethylation [+57.02146 Da] as a fixed modification and Methionine oxidation [+15.9949 Da], Asparagine/Glutamine deamidation [+0.9840 Da] and Tris adducts on Asparagine [+104.0712 Da] as variable modifications. Numbers in brackets correspond to the variable modification associated additional mass (in Daltons) while fixed modifications were not included for clarity. Peptides are numbered according to Supplementary Figure 8. A summary of search parameters is depicted below the table.

| # PEPTIDE | IEX FRACTION | PEPTIDE                                 | SCAN COUNTS | MODIFICATION |
|-----------|--------------|-----------------------------------------|-------------|--------------|
| 1         | c            | SRVQ[0.9840]PTESIVR                     | 2           | DEAMIDATED   |
| 1         | d            | SRVQ[0.9840]PTESIVR                     | 1           | DEAMIDATED   |
| 1         | d            | VQPTESIVR                               | 275         | NON-MODIFIED |
| 1         | c            | VQPTESIVR                               | 261         | NON-MODIFIED |
| 1         | b            | VQPTESIVR                               | 251         | NON-MODIFIED |
| 1         | e            | VQPTESIVR                               | 160         | NON-MODIFIED |
| 1         | f            | VQPTESIVR                               | 148         | NON-MODIFIED |
| 1         | a            | VQPTESIVR                               | 125         | NON-MODIFIED |
| 1         | b            | SRVQPTESIVR                             | 25          | NON-MODIFIED |
| 1         | a            | SRVQPTESIVR                             | 15          | NON-MODIFIED |
| 1         | c            | SRVQPTESIVR                             | 11          | NON-MODIFIED |
| 1         | d            | SRVQPTESIVR                             | 10          | NON-MODIFIED |
| 1         | d            | RSRVQPTESIVR                            | 8           | NON-MODIFIED |
| 1         | e            | SRVQPTESIVR                             | 4           | NON-MODIFIED |
| 1         | b            | RSRVQPTESIVR                            | 3           | NON-MODIFIED |
| 1         | f            | SRVQPTESIVR                             | 3           | NON-MODIFIED |
| 1         | a            | RSRVQPTESIVR                            | 2           | NON-MODIFIED |
| 2         | a            | FPN[0.9840]ITNLCPFGVEVFN[0.9840]ATR     | 2           | DEAMIDATED   |
| 2         | b            | FPN[0.9840]ITNLCPFGVEVFN[0.9840]ATR     | 2           | DEAMIDATED   |
| 3         | d            | FASVYAWN[0.9840]R                       | 3           | DEAMIDATED   |
| 3         | c            | FASVYAWN[0.9840]R                       | 2           | DEAMIDATED   |
| 3         | b            | FASVYAWN[0.9840]R                       | 1           | DEAMIDATED   |
| 3         | d            | FASVYAWN[0.9840]RK                      | 1           | DEAMIDATED   |
| 3         | d            | FASVYAWNR                               | 519         | NON-MODIFIED |
| 3         | b            | FASVYAWNR                               | 451         | NON-MODIFIED |
| 3         | c            | FASVYAWNR                               | 424         | NON-MODIFIED |
| 3         | f            | FASVYAWNR                               | 397         | NON-MODIFIED |
| 3         | a            | FASVYAWNR                               | 326         | NON-MODIFIED |
| 3         | e            | FASVYAWNR                               | 234         | NON-MODIFIED |
| 3         | a            | FASVYAWNRRK                             | 18          | NON-MODIFIED |
| 3         | e            | FASVYAWNRRK                             | 13          | NON-MODIFIED |
| 3         | d            | FASVYAWNRRK                             | 11          | NON-MODIFIED |
| 3         | c            | FASVYAWNRRK                             | 6           | NON-MODIFIED |
| 3         | f            | FASVYAWNRRK                             | 4           | NON-MODIFIED |
| 3         | b            | FASVYAWNRRK                             | 3           | NON-MODIFIED |
| 4         | f            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 71          | DEAMIDATED   |
| 4         | a            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 45          | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 37          | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 37          | DEAMIDATED   |
| 4         | c            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 35          | DEAMIDATED   |
| 4         | e            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 29          | DEAMIDATED   |
| 4         | b            | ISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK           | 23          | DEAMIDATED   |
| 4         | b            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 18          | DEAMIDATED   |
| 4         | a            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 16          | DEAMIDATED   |
| 4         | c            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 13          | DEAMIDATED   |
| 4         | e            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 12          | DEAMIDATED   |
| 4         | f            | ISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK           | 10          | DEAMIDATED   |
| 4         | a            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 9           | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 7           | DEAMIDATED   |
| 4         | c            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 5           | DEAMIDATED   |
| 4         | b            | ISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK           | 3           | DEAMIDATED   |
| 4         | e            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 3           | DEAMIDATED   |
| 4         | f            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 3           | DEAMIDATED   |
| 4         | b            | RISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK          | 2           | DEAMIDATED   |
| 4         | e            | RISN[0.9840]CVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK  | 2           | DEAMIDATED   |
| 4         | f            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK          | 2           | DEAMIDATED   |
| 4         | c            | ISN[0.9840]CVADYSVLYNSASFSTFK           | 2           | DEAMIDATED   |
| 4         | b            | RISNCVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFKCYGVSPTK  | 1           | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | ISN[0.9840]CVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK | 1           | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | RISN[0.9840]CVADYSVLYN[0.9840]SASFSTFK  | 1           | DEAMIDATED   |
| 4         | d            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 815         | NON-MODIFIED |
| 4         | c            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 775         | NON-MODIFIED |
| 4         | b            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 713         | NON-MODIFIED |
| 4         | a            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 632         | NON-MODIFIED |
| 4         | e            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 624         | NON-MODIFIED |
| 4         | f            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFK                   | 404         | NON-MODIFIED |
| 4         | d            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 262         | NON-MODIFIED |
| 4         | c            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 155         | NON-MODIFIED |
| 4         | b            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 100         | NON-MODIFIED |
| 4         | e            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 85          | NON-MODIFIED |
| 4         | a            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 74          | NON-MODIFIED |
| 4         | f            | RISNCVADYSVLYNSASFSTFK                  | 11          | NON-MODIFIED |
| 4         | b            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK           | 3           | NON-MODIFIED |
| 4         | d            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK           | 3           | NON-MODIFIED |
| 4         | a            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK           | 2           | NON-MODIFIED |
| 4         | f            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK           | 2           | NON-MODIFIED |
| 4         | c            | ISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK           | 1           | NON-MODIFIED |

## continuación Tabla Suplementaria 6

|   |   |                                               |     |              |
|---|---|-----------------------------------------------|-----|--------------|
| 4 | b | RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPK                 | 1   | NON-MODIFIED |
| 4 | a | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 3   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | c | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 4   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | b | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 2   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | b | ISN[104.0712]CVADYSVLYNSASFSTFK               | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | d | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 5   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | d | ISN[0.9840]CVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK       | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | e | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 3   | TRIS ADDUCT  |
| 4 | f | ISNCVADYSVLYN[104.0712]SASFSTFK               | 3   | TRIS ADDUCT  |
| 5 | d | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 33  | DEAMIDATED   |
| 5 | d | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 22  | DEAMIDATED   |
| 5 | e | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 21  | DEAMIDATED   |
| 5 | c | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 11  | DEAMIDATED   |
| 5 | a | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 10  | DEAMIDATED   |
| 5 | a | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 10  | DEAMIDATED   |
| 5 | b | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 10  | DEAMIDATED   |
| 5 | c | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 8   | DEAMIDATED   |
| 5 | f | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 7   | DEAMIDATED   |
| 5 | a | LN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR                     | 6   | DEAMIDATED   |
| 5 | d | LN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR                     | 6   | DEAMIDATED   |
| 5 | b | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 5   | DEAMIDATED   |
| 5 | e | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIR                     | 5   | DEAMIDATED   |
| 5 | f | LN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR                     | 4   | DEAMIDATED   |
| 5 | f | LNDLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR                | 4   | DEAMIDATED   |
| 5 | a | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR              | 3   | DEAMIDATED   |
| 5 | d | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR              | 3   | DEAMIDATED   |
| 5 | c | LN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR                     | 3   | DEAMIDATED   |
| 5 | e | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR              | 2   | DEAMIDATED   |
| 5 | f | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR              | 2   | DEAMIDATED   |
| 5 | a | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIRGDEVR         | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | b | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIRGDEVR         | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | b | LN[0.9840]DLCFTNVYADSFVIR                     | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | d | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | d | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIR                    | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | e | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | c | CYGVSPKLN[0.9840]DLCFTN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR | 1   | DEAMIDATED   |
| 5 | d | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 557 | NON-MODIFIED |
| 5 | a | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 372 | NON-MODIFIED |
| 5 | c | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 245 | NON-MODIFIED |
| 5 | d | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 228 | NON-MODIFIED |
| 5 | e | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 226 | NON-MODIFIED |
| 5 | f | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 199 | NON-MODIFIED |
| 5 | a | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 168 | NON-MODIFIED |
| 5 | f | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 112 | NON-MODIFIED |
| 5 | e | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 103 | NON-MODIFIED |
| 5 | b | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 64  | NON-MODIFIED |
| 5 | b | LNDLCFTNVYADSFVIR                             | 58  | NON-MODIFIED |
| 5 | c | LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR                        | 44  | NON-MODIFIED |
| 5 | a | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 3   | NON-MODIFIED |
| 5 | d | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 3   | NON-MODIFIED |
| 5 | c | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 2   | NON-MODIFIED |
| 5 | e | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 2   | NON-MODIFIED |
| 5 | e | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIR                    | 2   | NON-MODIFIED |
| 5 | f | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIRGDEVR               | 2   | NON-MODIFIED |
| 5 | c | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIR                    | 1   | NON-MODIFIED |
| 5 | d | CYGVSPKLN[0.9840]VYADSFVIR                    | 1   | NON-MODIFIED |
| 6 | d | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWNSNLDK             | 20  | DEAMIDATED   |
| 6 | c | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWNSNLDK             | 8   | DEAMIDATED   |
| 6 | d | IADYN[0.9840]YK                               | 5   | DEAMIDATED   |
| 6 | b | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWNSNLDK             | 5   | DEAMIDATED   |
| 6 | e | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWNSNLDK             | 5   | DEAMIDATED   |
| 6 | e | IADYN[0.9840]YK                               | 4   | DEAMIDATED   |
| 6 | c | IADYN[0.9840]YK                               | 4   | DEAMIDATED   |
| 6 | b | IADYN[0.9840]YK                               | 3   | DEAMIDATED   |
| 6 | a | IADYN[0.9840]YK                               | 2   | DEAMIDATED   |
| 6 | b | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 6 | c | IADYN[0.9840]YKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK     | 1   | DEAMIDATED   |
| 6 | f | IADYNYK                                       | 92  | NON-MODIFIED |
| 6 | d | IADYNYK                                       | 73  | NON-MODIFIED |
| 6 | b | IADYNYK                                       | 65  | NON-MODIFIED |
| 6 | c | IADYNYK                                       | 62  | NON-MODIFIED |
| 6 | a | IADYNYK                                       | 59  | NON-MODIFIED |
| 6 | e | IADYNYK                                       | 58  | NON-MODIFIED |
| 6 | b | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 9   | NON-MODIFIED |
| 6 | c | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 6   | NON-MODIFIED |
| 6 | d | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 6   | NON-MODIFIED |
| 6 | a | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 5   | NON-MODIFIED |
| 6 | e | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 5   | NON-MODIFIED |
| 6 | f | QIAPGQTGKIADYNYK                              | 2   | NON-MODIFIED |
| 7 | f | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK                    | 25  | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK                    | 15  | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK                    | 14  | DEAMIDATED   |
| 7 | e | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK                    | 12  | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDK                    | 12  | DEAMIDATED   |

## continuación Tabla Suplementaria 6

|   |   |                                         |     |              |
|---|---|-----------------------------------------|-----|--------------|
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 8   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 6   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 5   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SNLDSK            | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]N[104.0712]LDSK | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[104.0712]LDSK  | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]N[0.9840]LDSK   | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]LDSK    | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]LDSKVGGNYNYLYR  | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]NLDSKVGGNYNYLYR | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 650 | NON-MODIFIED |
| 7 | c | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 451 | NON-MODIFIED |
| 7 | a | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 389 | NON-MODIFIED |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 278 | NON-MODIFIED |
| 7 | e | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 174 | NON-MODIFIED |
| 7 | f | LPDDFT GCVIAWNSNLDK                     | 170 | NON-MODIFIED |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 100 | NON-MODIFIED |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 95  | NON-MODIFIED |
| 7 | a | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 50  | NON-MODIFIED |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 40  | NON-MODIFIED |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 19  | NON-MODIFIED |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK              | 8   | NON-MODIFIED |
| 7 | a | QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK     | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | c | QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK     | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | b | QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT GCVIAWNSNLDK     | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWN[0.9840]SN[104.0712]LDSK  | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | b | LPDDFT GCVIAWNSN[0.9840]N[104.0712]LDSK | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSN[104.0712]LDSK          | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWN[104.0712]SNLDSK          | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFT GCVIAWNSN[104.0712]NLDSK         | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 8 | d | VGGN[0.9840]YNYLYR                      | 13  | DEAMIDATED   |
| 8 | e | VGGN[0.9840]YNYLYR                      | 11  | DEAMIDATED   |
| 8 | a | VGGN[0.9840]YNYLYR                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | b | VGGN[0.9840]YNYLYR                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | c | VGGN[0.9840]YNYLYR                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | b | VGGNYN[0.9840]YLYR                      | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | e | VGGNYN[0.9840]YLYR                      | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | c | VGGNYN[0.9840]YLYR                      | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | a | VGGNYN[0.9840]YLYR                      | 1   | DEAMIDATED   |
| 8 | d | VGGNYN[0.9840]YLYR                      | 1   | DEAMIDATED   |
| 8 | d | VGGNYNYLYR                              | 400 | NON-MODIFIED |
| 8 | f | VGGNYNYLYR                              | 348 | NON-MODIFIED |
| 8 | b | VGGNYNYLYR                              | 299 | NON-MODIFIED |
| 8 | c | VGGNYNYLYR                              | 286 | NON-MODIFIED |
| 8 | e | VGGNYNYLYR                              | 230 | NON-MODIFIED |
| 8 | a | VGGNYNYLYR                              | 225 | NON-MODIFIED |
| 8 | d | LPDDFT GCVIAWNSNLDKVKGGNYNYLYR          | 2   | NON-MODIFIED |
| 8 | a | LPDDFT GCVIAWNSNLDKVKGGNYNYLYR          | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | c | LPDDFT GCVIAWNSNLDKVKGGNYNYLYR          | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | b | LPDDFT GCVIAWNSNLDKVKGGNYNYLYR          | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | f | LPDDFT GCVIAWNSNLDKVKGGNYNYLYR          | 1   | NON-MODIFIED |
| 9 | d | KSN[0.9840]LKPFEER                      | 19  | DEAMIDATED   |
| 9 | d | SN[0.9840]LKPFEER                       | 12  | DEAMIDATED   |
| 9 | c | SN[0.9840]LKPFEER                       | 10  | DEAMIDATED   |
| 9 | b | SN[0.9840]LKPFEER                       | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | e | SN[0.9840]LKPFEER                       | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | c | KSN[0.9840]LKPFEER                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | a | SN[0.9840]LKPFEER                       | 8   | DEAMIDATED   |
| 9 | b | KSN[0.9840]LKPFEER                      | 8   | DEAMIDATED   |
| 9 | f | KSN[0.9840]LKPFEER                      | 5   | DEAMIDATED   |
| 9 | e | KSN[0.9840]LKPFEER                      | 3   | DEAMIDATED   |

## continuación Tabla Suplementaria 6

|   |   |                                        |     |              |
|---|---|----------------------------------------|-----|--------------|
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 8   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 7   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 6   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 5   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 4   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | e | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]NLDSK   | 3   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK           | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK     | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 2   | DEAMIDATED   |
| 7 | a | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SNLDSK            | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]N[104.0712]LDSK | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[104.0712]LDSK  | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]N[0.9840]LDSK   | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[0.9840]LDSK    | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSK    | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK     | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSK            | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]LDSKVGGNVNYLYR  | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]NLDSKVGGNVNYLYR | 1   | DEAMIDATED   |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 650 | NON-MODIFIED |
| 7 | c | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 451 | NON-MODIFIED |
| 7 | a | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 389 | NON-MODIFIED |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 278 | NON-MODIFIED |
| 7 | e | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 174 | NON-MODIFIED |
| 7 | f | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK                  | 170 | NON-MODIFIED |
| 7 | c | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 100 | NON-MODIFIED |
| 7 | d | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 95  | NON-MODIFIED |
| 7 | a | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 50  | NON-MODIFIED |
| 7 | e | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 40  | NON-MODIFIED |
| 7 | b | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 19  | NON-MODIFIED |
| 7 | f | IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK           | 8   | NON-MODIFIED |
| 7 | a | QIAPGQTKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK   | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | c | QIAPGQTKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK   | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | b | QIAPGQTKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDLDSK   | 1   | NON-MODIFIED |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWN[0.9840]SN[104.0712]LDSK  | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | b | LPDDFTGCVIAWNSN[0.9840]N[104.0712]LDSK | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSN[104.0712]LDSK          | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWN[104.0712]SNLDSK          | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 7 | d | LPDDFTGCVIAWNSN[104.0712]NLDSK         | 1   | TRIS ADDUCT  |
| 8 | d | VGGN[0.9840]VNYLYR                     | 13  | DEAMIDATED   |
| 8 | e | VGGN[0.9840]VNYLYR                     | 11  | DEAMIDATED   |
| 8 | a | VGGN[0.9840]VNYLYR                     | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | b | VGGN[0.9840]VNYLYR                     | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | c | VGGN[0.9840]VNYLYR                     | 9   | DEAMIDATED   |
| 8 | b | VGGNYN[0.9840]VLYR                     | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | e | VGGNYN[0.9840]VLYR                     | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | c | VGGNYN[0.9840]VLYR                     | 2   | DEAMIDATED   |
| 8 | a | VGGNYN[0.9840]VLYR                     | 1   | DEAMIDATED   |
| 8 | d | VGGNYN[0.9840]VLYR                     | 1   | DEAMIDATED   |
| 8 | d | VGGNYNYLYR                             | 400 | NON-MODIFIED |
| 8 | f | VGGNYNYLYR                             | 348 | NON-MODIFIED |
| 8 | b | VGGNYNYLYR                             | 299 | NON-MODIFIED |
| 8 | c | VGGNYNYLYR                             | 286 | NON-MODIFIED |
| 8 | e | VGGNYNYLYR                             | 230 | NON-MODIFIED |
| 8 | a | VGGNYNYLYR                             | 225 | NON-MODIFIED |
| 8 | d | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSKVGGNVNYLYR        | 2   | NON-MODIFIED |
| 8 | a | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSKVGGNVNYLYR        | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | c | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSKVGGNVNYLYR        | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | b | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSKVGGNVNYLYR        | 1   | NON-MODIFIED |
| 8 | f | LPDDFTGCVIAWNSNLDLDSKVGGNVNYLYR        | 1   | NON-MODIFIED |
| 9 | d | KSN[0.9840]LKPFEER                     | 19  | DEAMIDATED   |
| 9 | d | SN[0.9840]LKPFEER                      | 12  | DEAMIDATED   |
| 9 | c | SN[0.9840]LKPFEER                      | 10  | DEAMIDATED   |
| 9 | b | SN[0.9840]LKPFEER                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | e | SN[0.9840]LKPFEER                      | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | c | KSN[0.9840]LKPFEER                     | 9   | DEAMIDATED   |
| 9 | a | SN[0.9840]LKPFEER                      | 8   | DEAMIDATED   |
| 9 | b | KSN[0.9840]LKPFEER                     | 8   | DEAMIDATED   |
| 9 | f | KSN[0.9840]LKPFEER                     | 5   | DEAMIDATED   |
| 9 | e | KSN[0.9840]LKPFEER                     | 3   | DEAMIDATED   |







## continuación Tabla Suplementaria 6

|    |   |                                           |    |              |
|----|---|-------------------------------------------|----|--------------|
| 12 | c | NKCVNFGPFEDDDDK                           | 24 | NON-MODIFIED |
| 12 | f | NKCVNFGPFEDDDDK                           | 24 | NON-MODIFIED |
| 12 | b | NKCVNFGPFEDDDDK                           | 22 | NON-MODIFIED |
| 12 | e | NKCVNFGPFEDDDDK                           | 20 | NON-MODIFIED |
| 12 | a | CVN[104.0712]FGPFEDDDDK                   | 2  | TRIS ADDUCT  |
| 12 | b | CVN[104.0712]FGPFEDDDDK                   | 1  | TRIS ADDUCT  |
| 12 | d | STN[104.0712]LVKN[104.0712]KCVNFGPFEDDDDK | 1  | TRIS ADDUCT  |
| 12 | d | CVN[104.0712]FGPFEDDDDK                   | 1  | TRIS ADDUCT  |
| 12 | d | STNLVKN[104.0712]KCVN[104.0712]FGPFEDDDDK | 1  | TRIS ADDUCT  |

# comet\_version 2021.01 rev. 0

Search Parameters:

Peptide\_mass\_tolerance for search = 35 ppm

Peptide mass tolerance (after filtering): 10 pm

Mass\_type\_parent = monoisotopic masses

Enzyme: trypsin (full specific)

Allowed\_missed\_cleavage = 2

Variable modification: Asp/Gln deamidation (+ 0.9840)

Variable modifications: Met oxidation (+ 15.9949)

Variable modifications: Asp Tris adduct (+ 104.071154)

Fix modifications: Cys carbamidomethylation (+ 57.0215)

Database: Drosophila melanogaster sequences downloaded from Uniprot (june 2020) + RDB<sup>cv</sup> sequence + common proteomics contaminants (target -reverse)

PTMs filtered **FDR<1%** at the protein level

## 2. ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO PRIMER AUTOR

### PUBLICACIÓN 1

Carrión, F. *et al.* (2023). Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface. *Protein Science* 32



Received: 3 April 2023 | Revised: 6 June 2023 | Accepted: 3 July 2023

DOI: 10.1002/pro.4721

METHODS AND APPLICATIONS



## Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface

Federico Carrión<sup>1</sup> | Florencia Rammauro<sup>1,2</sup> | Natalia Olivero-Deibe<sup>1</sup> |  
Martín Fló<sup>1,2</sup> | María Magdalena Portela<sup>3,4</sup> | Analía Lima<sup>3</sup> | Rosario Durán<sup>3</sup> |  
Otto Pritsch<sup>1,2</sup> | Sergio Bianchi<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Inmunobiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, Institut Pasteur de Montevideo & Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>5</sup>Departamento de Fisiopatología, Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>6</sup>Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

#### Correspondence

Federico Carrión, Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.  
Email: fcarrion@pasteur.edu.uy

Sergio Bianchi, Departamento de Fisiopatología, Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.  
Email: sbianchi@pasteur.edu.uy

#### Funding information

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Grant/Award Number: FMV\_3\_2022\_1\_172395; Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM), Grant/Award Number: COF03/11

Review Editor: John Kuriyan

#### Abstract

The interaction between the receptor-binding domain (RBD) of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and the peptidase domain of the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) allows the first specific contact at the virus–cell interface making it the main target of neutralizing antibodies. Here, we show a unique and cost-effective protocol using *Drosophila* S2 cells to produce both RBD and soluble human ACE2 peptidase domain (shACE2) as thermostable proteins, purified via Strep-tag with yields  $>40 \text{ mg L}^{-1}$  in a laboratory scale. Furthermore, we demonstrate its binding with  $K_D$  values in the lower nanomolar range (independently of Strep-tag removal) and its capability to be blocked by serum antibodies in a competition ELISA with Strep-Tactin-HRP as a proof-of-concept. In addition, we assess the capacity of RBD to bind native dimeric ACE2 overexpressed in human cells and its antigen properties with specific serum antibodies. Finally, for completeness, we analyzed RBD microheterogeneity associated with glycosylation and negative charges, with negligible effect on binding either with antibodies or shACE2. Our system represents an accessible and reliable tool for designing *in-house* surrogate virus neutralization tests (sVNTs), enabling the rapid characterization of neutralizing humoral responses elicited against vaccines or infection, especially in the absence of facilities to conduct virus neutralization tests. Moreover, our biophysical and biochemical characterization of RBD and shACE2 produced in S2 cells lays the groundwork for adapting to different variants of concern (VOCs) to study humoral responses elicited against different VOCs and vaccine formulations.

#### KEYWORDS

ACE2, binding, *Drosophila*, microheterogeneity, neutralization, RBD, S2 cells, SARS-CoV-2, virus–cell interface

## 1 | INTRODUCTION

SARS-CoV-2, identified in Wuhan (China) at the end of 2019, infects humans and causes the coronavirus disease 2019 (COVID-19; Wu et al., 2020), which has led to an ongoing pandemic.

The SARS-CoV-2 virion displays on its surface a trimeric glycoprotein called spike, responsible for membrane fusion with the target cells after interacting through its receptor-binding domain (RBD) with the cellular receptor: the human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2; Watanabe et al., 2020; Zhao et al., 2020). The RBD is stabilized by four internal disulfides and contains a beta-stranded core that displays two N-glycosites and an extended loop spanning the receptor-binding motif (RBM; Lan et al., 2020). RBD interacts via the RBM with the peptidase domain of hACE2 (Lan et al., 2020) and is the main target of neutralizing antibodies (nAbs; Goldblatt et al., 2022).

The rapid spread of SARS-CoV-2 in 2020 was followed by the fast development of effective vaccines, which were globally distributed, showing inequalities in access (Mathieu et al., 2021), concomitant with the emergence of multiple variants of concern (VOCs) with increased virulence, transmission, and immune escape (Mistry et al., 2022). In addition, different vaccine platforms have been shown to trigger a robust humoral immune response that wanes after a few months, motivating several countries to implement vaccine booster immunization that improves the response (Pascuale et al., 2022; Rammauro et al., 2022).

Vaccines distributed worldwide are based on the ancestral Wuhan variant, which was superseded by several VOCs; to date, the Omicron subvariants capable of evading antibody neutralization (Hoffmann et al., 2022; Planas et al., 2022) dominates the scene, and new “variant-based mRNA booster doses” are being evaluated (Chalkias et al., 2022) while its benefits remain on discussion (Callaway, 2022). However, as individual countries move toward approving these booster doses, the risk of repeating the history of inequity in vaccine access becomes imminent. Therefore, affordable strategies are needed to assess the multiple local contexts to minimize these effects.

In the absence of well-defined correlates of protection, measuring nAbs is the best approach to determining the level of protection against SARS-CoV-2 (Goldblatt et al., 2022). The best option for determining nAbs are the *plaque reduction neutralization tests* (PRNTs) and *pseudo-typed virus neutralization tests* (PVNTs), which require high-cost infrastructure and are time-consuming, further increasing the gap in testing capacity, especially in low-income countries. Despite limitations, *surrogate*

*virus neutralization tests* (sVNTs) have emerged as affordable and fast alternatives for studying humoral neutralizing responses (Tan et al., 2020). By its simple design based on the blockade of RBD-ACE2 binding in multi-well plates, sVNTs can be produced *in-house* and achieved in standard laboratories, giving sovereignty in vaccine decision-making, notably when lacking PRNTs or PVNTs capabilities.

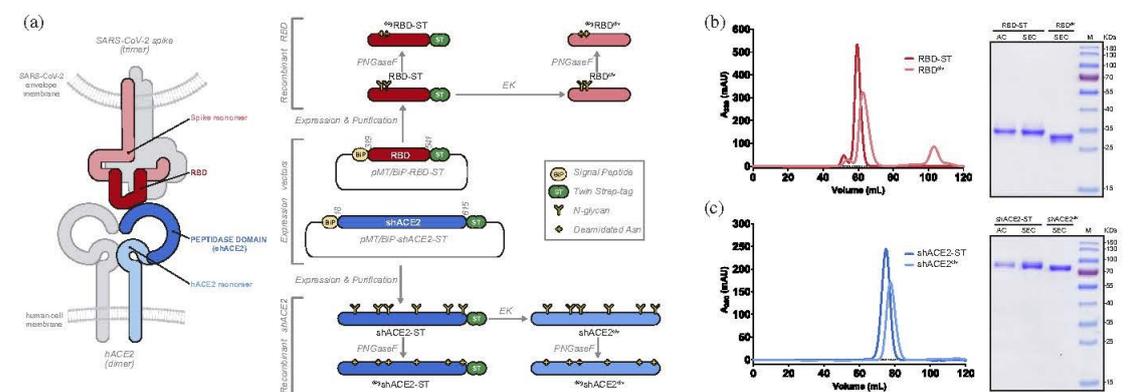
As spike and hACE2 are membrane glycoproteins, eukaryotic systems remain the most suitable for recombinant production, and mammal cell systems are the most frequently used. Insect cells appear as a good alternative, overcoming some issues associated with production times, costs, and yields, as well as scalability and risk of contamination (Tripathi & Shrivastava, 2019) with baculovirus-based systems being extensively used to produce soluble SARS-CoV-2 glycoproteins (Li et al., 2020; Maffei et al., 2021; Struble et al., 2022), virus-like particles (Sullivan et al., 2022) and protein subunits vaccines (Li et al., 2022) in *Spodoptera frugiperda* and *Trichoplusia ni* cells. Baculovirus-free insect cell systems have been shown to overcome some issues in production yield in *T. ni* (Korn et al., 2020), while examples using *Drosophila melanogaster* cells are scarce (Bagdonaite et al., 2021; Creutzmacher et al., 2022).

Here, we describe a simple pipeline to produce both the RBD of SARS-CoV-2 and the soluble peptidase domain of human ACE2 (shACE2) in *Drosophila* S2 cells with minimal technical requirements and high production yields. We also characterize its behavior in solution and demonstrate its binding, revealing strengths and weaknesses of the system for studying nAB responses elicited against SARS-CoV-2.

## 2 | RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1 | RBD and shACE2 proteins are purified from S2 culture supernatant

The recombinant protein design and their processing products are summarized in Figure 1a and described in Section 4. RBD-ST and shACE2-ST were both obtained in the culture supernatant and further purified by affinity chromatography (AC) with average yields of 40 and 60 mg L<sup>-1</sup>, respectively (Supporting Information Figure S1), outperforming yields obtained with similar constructions in insect cells (Korn et al., 2020; Li et al., 2020; Maffei et al., 2021). In addition, RBD-ST and shACE2-ST were purified by size exclusion chromatography (SEC) as monomeric proteins (Figure 1b,c), with exclusion volumes corresponding to 40.2 and 87.7 kDa, respectively (Supporting Information Figure S2A,B).



**FIGURE 1** Expression and purification of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a) Scheme showing virus–cell interface with the spike and ACE2 monomers in red and blue tones, respectively (left) and plasmids constructions with its respective processed recombinant products using the same color code (right). The names identifying each protein appear alongside each processing product (in black text) and are the same used throughout this work. (b) Preparative SEC (left) and Coomassie-stained SDS-PAGE (right) of purified RBD-ST and RBD<sup>clv</sup>. (c) Preparative SEC (left) and Coomassie-stained SDS-PAGE analysis (right) of purified shACE2-ST and shACE2<sup>clv</sup>. SDS-PAGE lanes are identified as AC (fractions eluted from affinity chromatography), SEC (size exclusion chromatography), and M (molecular weight marker).

## 2.2 | Strep-tag can be removed without compromising protein stability

As our strategy involved using the Strep-tag for multiple purposes, not only as a purification tag but also to obtain immobilized or labeled counterparts in *in vitro* binding assays, it was imperative to accomplish its removal without compromising protein stability. Consequently, upon Strep-tag removal, both RBD<sup>clv</sup> and shACE2<sup>clv</sup> showed an expected average size reduction of ~3 kDa (Figure 1b,c; Supporting Information Figure S2C,D), while solubility was not affected as seen by dynamic light scattering (DLS) (Supporting Information Figure S3; Supporting Information Table S1).

Both RBD-ST and RBD<sup>clv</sup> showed similar thermostability by nano-differential scanning fluorimetry (nanoDSF), with broad transitions and melting temperatures ( $T_m$ ) of 50.7 and 51.5°C, respectively, above those reported with a similar construction using insect cells (Li et al., 2020) (Figure 2a). Both showed reversible thermal denaturation with refolding  $T_m$  values slightly below their unfolding counterparts (50.1 and 50.4°C, respectively). RBD unfolding transition in the presence of DTT was not detected, probably due to early denaturation upon disulfide reduction (Figure 2b), which is known to have a critical role on RBD secondary structure (Grishin et al., 2022), even affecting its binding with ACE2 (Shi et al., 2022).

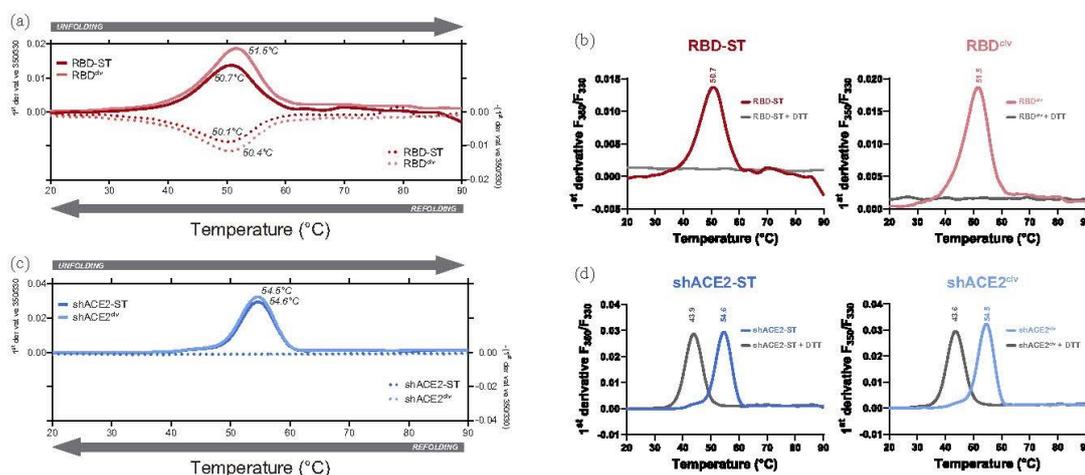
On the other hand, shACE2-ST and shACE2<sup>clv</sup> showed irreversible thermal unfolding with narrower transitions and slightly higher  $T_m$  values (54.6 and 54.5°C, respectively), agreeing with previous reports (Glasgow et al., 2020; Figure 2c). However, as opposed to

RBD, transitions in the presence of DTT are still detected with both, showing a shift in  $T_m$  values > 10°C (Figure 2d), suggesting a less preponderant role of disulfides in shACE2 stability as previously seen in human cells expression systems (Grishin et al., 2022).

## 2.3 | RBD and shACE2 binding functions resembles their natural counterparts

Protein binding was measured by isothermal titration calorimetry (ITC) using two independent experimental setups (Figure 3a). Both experiments were analyzed independently, confirming 1:1 binding stoichiometry and giving very similar thermodynamic parameters with a strong enthalpic contribution reminiscent of hydrophilic molecular contacts (Lan et al., 2020), further confirming that binding is not affected upon Strep-tag removal (Supporting Information Table S2). Measured  $K_D$  values range between 17.1 and 27.0 nM, in complete agreement with those obtained in similar conditions using proteins expressed in human cells (Prévost et al., 2021).

We also evaluated binding by surface performance resonance (SPR), injecting RBD<sup>clv</sup> over captured shACE2-ST. Experimental datasets obtained with variable levels of immobilized shACE2-ST gave an average  $K_D = 8.29 \pm 0.69$  nM (Figure 3b; Supporting Information Table S3), consistent with proteins expressed in human (Liu et al., 2021) and insect cells (Lan et al., 2020). Additionally, we demonstrated that RBD-ST binds full-length cell-associated hACE2 in a dose-



**FIGURE 2** Thermostability of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a,c) Unfolding and refolding scans obtained by nanoDSF with both RBD-ST/RBD<sup>clv</sup> and shACE2-ST/shACE2<sup>clv</sup>, respectively. (b,d) Unfolding scans of reduced RBD-ST/RBD<sup>clv</sup> and shACE2-ST/shACE2<sup>clv</sup>. Unfolding is represented with continuous lines, while refolding is shown with dotted lines using the same color code. Gray-colored traces correspond to scans done in the presence of DTT. T<sub>m</sub> values are shown next to each transition peak.

dependent way, as seen by flow cytometry (Figure 3c), and that RBD<sup>clv</sup> is specifically recognized by human sera from naturally infected individuals (Figure 3d) as seen before (Amanat et al., 2020; Rammauro et al., 2022). Finally, we demonstrate with competition ELISA that reactive serum samples can block the interaction between immobilized RBD<sup>clv</sup> and soluble shACE2-ST, providing proof-of-concept for its usage in sVNTs developed *in-house* (Figure 3e).

## 2.4 | RBD shows microheterogeneity related with glycans and negative-charges

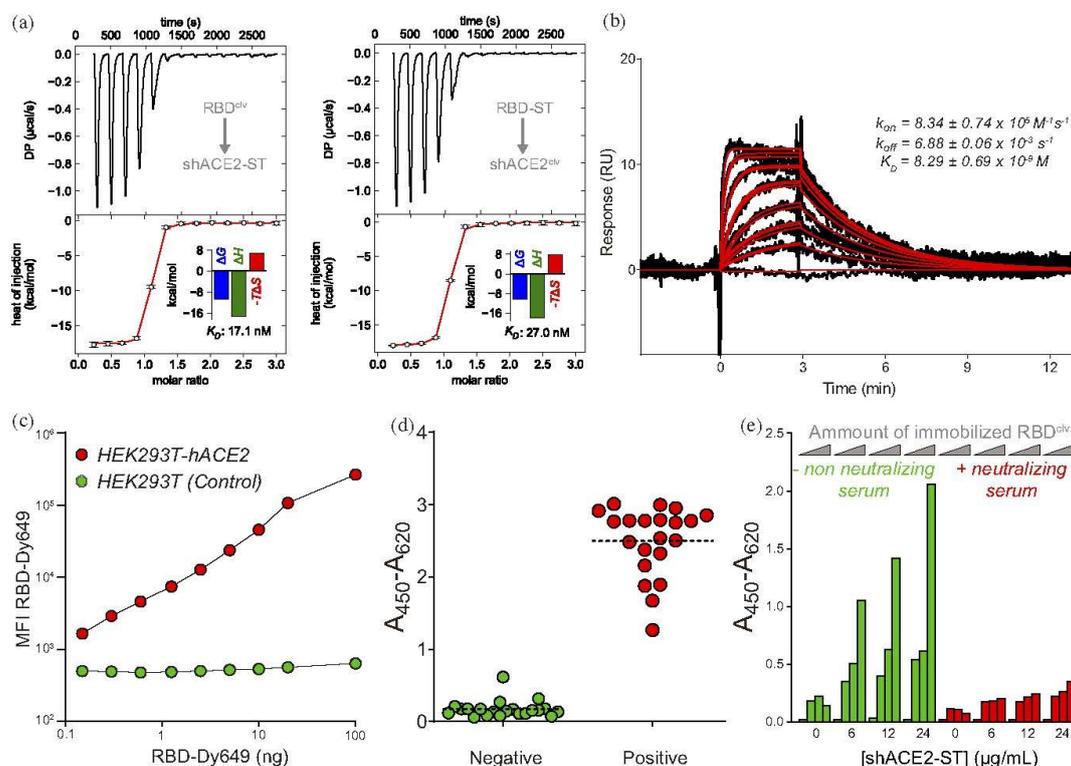
MALDI-TOF/TOF analysis of RBD-ST allowed us to identify three out of four total disulfide bonds (Figure 4a). The ion corresponding to the intra-peptide bridge (C<sub>480</sub>-C<sub>488</sub>) was detected in MS-spectrum ( $m/z = x$ ), while the inter-peptide crosslinked cysteines (C<sub>379</sub>-C<sub>432</sub> and C<sub>391</sub>-C<sub>525</sub>) were further corroborated by MS/MS analysis (Supporting Information Figure S4). The C<sub>538</sub>, which forms a disulfide with a spike's domain absent in our construction, was only detected as a reduced or cysteinylated residue (Supporting Information Figure S5). Peptides containing C<sub>336</sub> and C<sub>361</sub> (which form a disulfide on the viral spike protein) were only identified after reduction/alkylation, with the peptide 329-346 containing different combinations of paucimanosidic and high mannose glycans at N<sub>331</sub> and N<sub>343</sub> (Figure 4b; Supporting Information Figure S6).

We compared RBD<sup>clv</sup> and its N-deglycosylated product (de<sup>g</sup>RBD<sup>clv</sup>) with two-dimensional electrophoresis

(2D-SDS-PAGE), showing several spots with a variable isoelectric point (pI) below its theoretical value (pI = 8.5) (Supporting Information Figure S7,A,B). Treatment with PNGaseF evidenced a size reduction, accompanied by a relative increase in the intensity of more acidic species (probably because of asparagine deamidation) but still showing microheterogeneity due to negative charges.

We confirmed this microheterogeneity using ionic exchange chromatography (IEX) and obtaining several fractions of RBD<sup>clv</sup> (hereinafter identified from *a* to *f*), which eluted differentially in a salt concentration gradient (Figure 4c). In addition, we N-deglycosylated all RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions evidencing the same electrophoretic shift in SDS-PAGE, thus suggesting that N-glycan composition is homogeneously distributed along IEX fractions and not strictly associated with charges microheterogeneity (Supporting Information Figure S7,C,D).

RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions and their deglycosylated counterparts were sequentially reduced/alkylated and subjected to nano-HPLC MS/MS analysis. As seen with MALDI-TOF/TOF, the unmodified sequence of the peptide 329-346 was not identified in any case (Supporting Information Table S4), suggesting that it is heavily modified. In parallel, we identified this peptide in all de<sup>g</sup>RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions containing deamidated asparagine residues (Supporting Information Table S5). Scans corresponding to doubly-deamidated peptide 329-346 represented 91%, while deamidation in a single asparagine corresponded to 0.2% and 8.8% for N<sub>331</sub> and N<sub>343</sub>, respectively (Supporting Information Table S6). These results show that N-glycan occupancy in predicted sites is



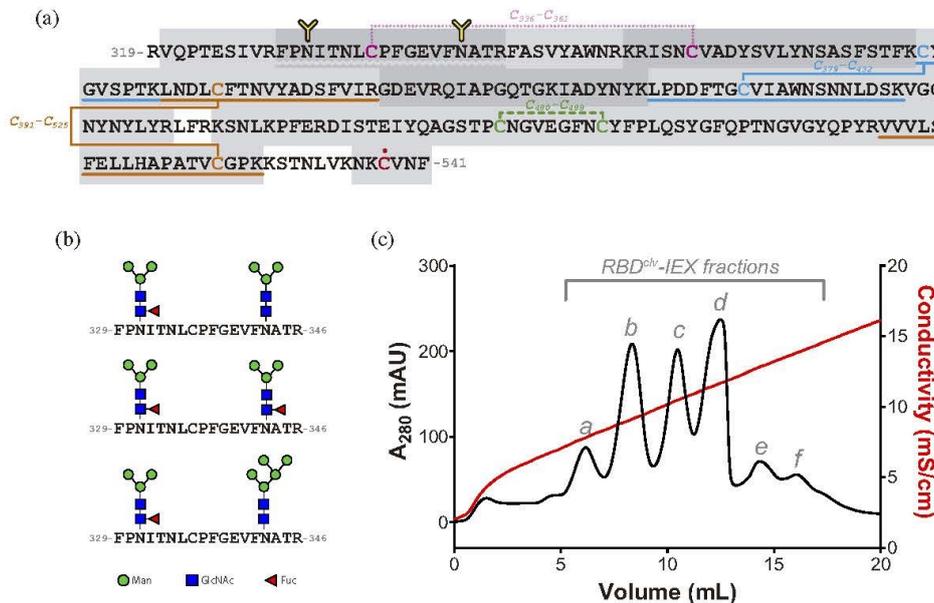
**FIGURE 3** Functional analysis of RBD and shACE2 recombinant proteins. (a) ITC analysis of shACE2-ST titrated with RBD<sup>clv</sup> (left panel), and shACE2<sup>2clv</sup> titrated with RBD-ST (right panel). Each panel comprises the corrected thermogram upon baseline subtraction (up) and a schematic representation of the titration setup (inset). The integrated heat values fitting to a hetero-association model in red (bottom) are accompanied by the thermodynamic signature and  $K_D$  values (inset). (b) Representative SPR experiment with RBD<sup>clv</sup> injected over captured shACE2-ST, with superimposed sensorgrams (black) and fitting to 1:1 Langmuir interaction model (red) and the average kinetic parameters obtained in three independent experiments (Supporting Information Table S3). (c) Mean fluorescence intensity (MFI) measured by flow cytometry in cells over-expressing hACE2 (red) and control cells (green), incubated with increasing amounts of fluorescent RBD (x-axis). (d) ELISA with a set of human sera identified as negative (pre-pandemic) and positive (confirmed by PCR and a commercial anti-SARS-CoV-2 ELISA) using RBD<sup>clv</sup> as antigen. (e) Competition ELISA between different concentrations of shACE2-ST (x-axis) and two serum samples: a negative non-neutralizing serum (pre-pandemic, in green) and a positive neutralizing serum (confirmed with a commercial sVNT) to bind increasing amounts of immobilized RBD<sup>clv</sup> (represented with gray triangles above each group).

high, with N<sub>331</sub> less occupied than N<sub>343</sub>, as seen before with RBD expressed in human and insect cells (Bagdonaite et al., 2021; Sanda et al., 2021).

Regarding mono-glycosylated peptide 329–346, we identified paucimannosidic and high-mannose glycans only on N<sub>343</sub> (Supporting Information Table S7), probably because of the higher occupancy mentioned above. In contrast, double glycosylated peptides were not detected, probably due to their poorer ionization efficiency and high hydrophilicity, which impedes their binding to reversed-phase columns (Kozlik et al., 2017). Based on this, we propose that such mono-glycosylated peptides constitute an infrequent fraction of glycopeptides, but one that may help us elucidate which moieties are most

abundant in RBD expressed in S2 cells without ruling out the existence of motifs with higher content in mannose.

As for O-glycosylation, Tn and Core 1-type glycans were also identified in deg-RBD<sup>clv</sup> using nano-HPLC MS/MS. The most frequent O-glycosites were identified on threonine residues belonging to N-glycosylation sequons (T<sub>333</sub> and T<sub>345</sub>), almost exclusively when the precedent N was not deamidated. This suggests that O-glycosylation only occurs at these positions in the absence of N-glycans, supporting the hypothesis that O-glycans could be masking unusually unoccupied N-glycosites on RBD expressed in S2 cells (Bagdonaite et al., 2021). In parallel, Core 1-type glycans were identified at T<sub>323</sub> and S<sub>325</sub> (with twice the frequency of Tn), as



**FIGURE 4** RBD micro-heterogeneity. (a) The RBD amino acidic sequence is shown with gray numbers indicating the spike position of N- and C-terminal residues (cleavage and Strep-tag sequences were omitted for clarity). Disulfide bonds are shown as Cysteines (c) linked by connectors identified with a unique color code for each pair and colored labels showing the Cysteine's positions. Peptides identified by MALDI-TOF/TOF in non-reducing conditions are identified in light gray, with the identified crosslinked peptides underlined using the same color code for each disulfide and paired cysteines. Sequences marked with dark gray boxes highlight those peptides exclusively identified in reduced/alkylated RBD-ST. The disulfide represented with a dashed green line was identified as an intra-peptide bond, those identified with continuous light blue and orange connectors were identified as crosslinked peptides (Supporting Information Figure S4), and the disulfide identified with dotted lines (pale magenta) could not be directly identified by MALDI-TOF/TOF analysis. The unpaired C<sub>338</sub> is shown in red with an asterisk. Predicted N-glycosylation sites are shown with a yellow Y above the asparagine residues (N<sub>331</sub> and N<sub>343</sub>), and the corresponding glycopeptide (between 329 and 346) is underlined with a light-gray wavy line. (b) Glycopeptide 329–346 was identified by MALDI-TOF/TOF with N-glycan modifications at N<sub>331</sub> and N<sub>343</sub>. (Supporting Information Figure S6). (c) Preparative ion exchange chromatography (IEX) of RBD<sup>clv</sup> showing differentially charged species named from a–f above each peak.

reported in human (Eldrid et al., 2021; Shajahan et al., 2020; Watanabe et al., 2020) and insect cells (Bagdonaite et al., 2021). Other O-glycosites were also identified with very low frequencies on RBD (Supporting Information Table S8). Our glycan characterization of RBD expressed in S2 insect cells is in full agreement with Bagdonaite et al. (2021), who used its proprietary system with different accessory sequences.

We looked for post-translational modifications (PTMs) that could explain negative charge micro-heterogeneity in RBD. Since sialylation (the most frequent source of negative charge micro-heterogeneity in glycoproteins) is rare in insect cells (Harrison & Jarvis, 2006), we excluded it from the analyses. In this regard, we found spontaneous deamidation of asparagine residues in all RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions (Supporting Information Figure S8A), with peptide #10 (spanning about half of the RBM sequence) as the most frequently deamidated peptide (Supporting Information Figure S8B). However,

as deamidation frequency was not correlated with charges, we could not solely attribute micro-heterogeneity to its occurrence. In addition, Tris adducts on deamidated asparagine (and glutamine) residues (which could be further modifying deamidated asparagine residues [Kabadi et al., 2016] and affecting its detection) remained as a very marginal fraction (0.1%–1.3%) (Supporting Information Figure S8A; Supporting Information Table S9). Asparagine deamidation to aspartate (or iso-aspartate) entails changes in overall charge (and protein backbone) and has been associated with aging in *betacoronaviruses* spike protein, with RBM described as a deamidation hotspot (Lorenzo et al., 2021). Our results suggest that deamidation in the RBM of RBD expressed in S2 cells is responsible for the presence of negative charges; however, despite our efforts, we were unable to identify a set of modifications that exclusively explain micro-heterogeneity by negative charges in RBD, and additional studies are needed to fill this gap.

## 2.5 | Micro-heterogeneity does not affect RBD functionality

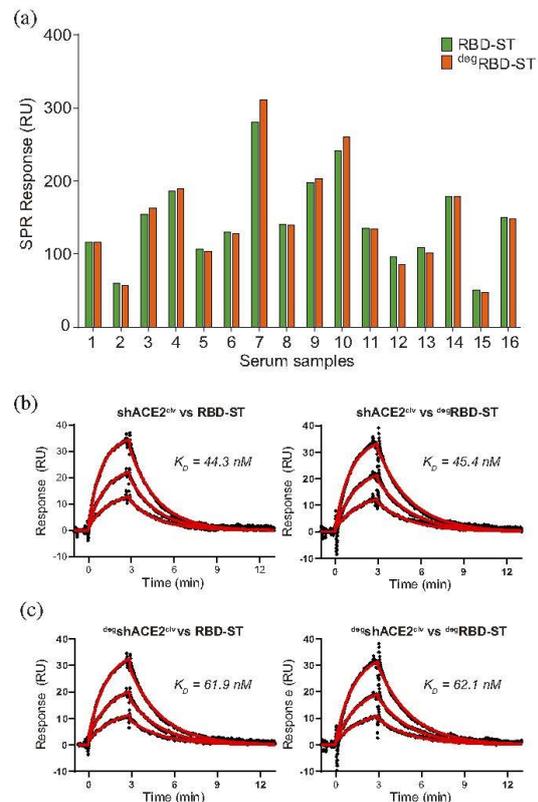
Spike glycosylation shields its surface, keeping it away from the immune system, and even promotes conformational movements that expose RBM to hACE2 (Casalino et al., 2020; Zhao et al., 2020). However, this effect is less noticeable when the RBD is expressed as a single domain (Gstöttner et al., 2021). We used SPR to compare specific recognition by a set of sera from vaccinated individuals with RBD-ST and <sup>deg</sup>RBD-ST, not evidencing significant differences in binding (Figure 5a; Supporting Information Figure S9).

We also evaluated by SPR the effect of glycosylation on RBD-shACE2 interaction, simultaneously injecting shACE2<sup>clv</sup> (or <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup>) over RBD-ST and <sup>deg</sup>RBD-ST, captured in two parallel surfaces. Throughout this work, we avoided shACE2<sup>clv</sup> as an analyte in SPR experiments since affinity was underestimated, probably due to non-specific interactions with the sensorchip surface. However, in this case, it allowed us to detect differences in binding accurately (if any) using virtually the same analyte injection, thus avoiding protein quantification biases. Furthermore, despite showing differences with ITC and SPR (using RBD<sup>clv</sup> as an analyte), binding affinities remained invariable despite deglycosylation of captured RBD-ST (Figure 5b,c; Supporting Information Table S10), thus showing that N-glycosylation does not affect its binding, as previously shown (Sun et al., 2020).

To complete our RBD characterization, we focused on the effect of negative charge micro-heterogeneity on its binding with shACE2 and specific serum antibodies.

First, we did SPR experiments injecting RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions over captured shACE2-ST, evidencing higher affinities with respect to control experiments using pre-IEX RBD<sup>clv</sup> (mainly due to higher association rate constants,  $k_{on}$ ; Figure 6a-c; Supporting Information Table S11). Since dissociation rate constant ( $k_{off}$ ) fitting is independent of the analyte concentration and considering that IEX implies an extra purification step (Figure 6d), we suggest slight differences in affinities are related to protein purification/quantification. Overall, our results demonstrate that micro-heterogeneity of RBD due to negative charges has no detrimental effect on its binding with shACE2.

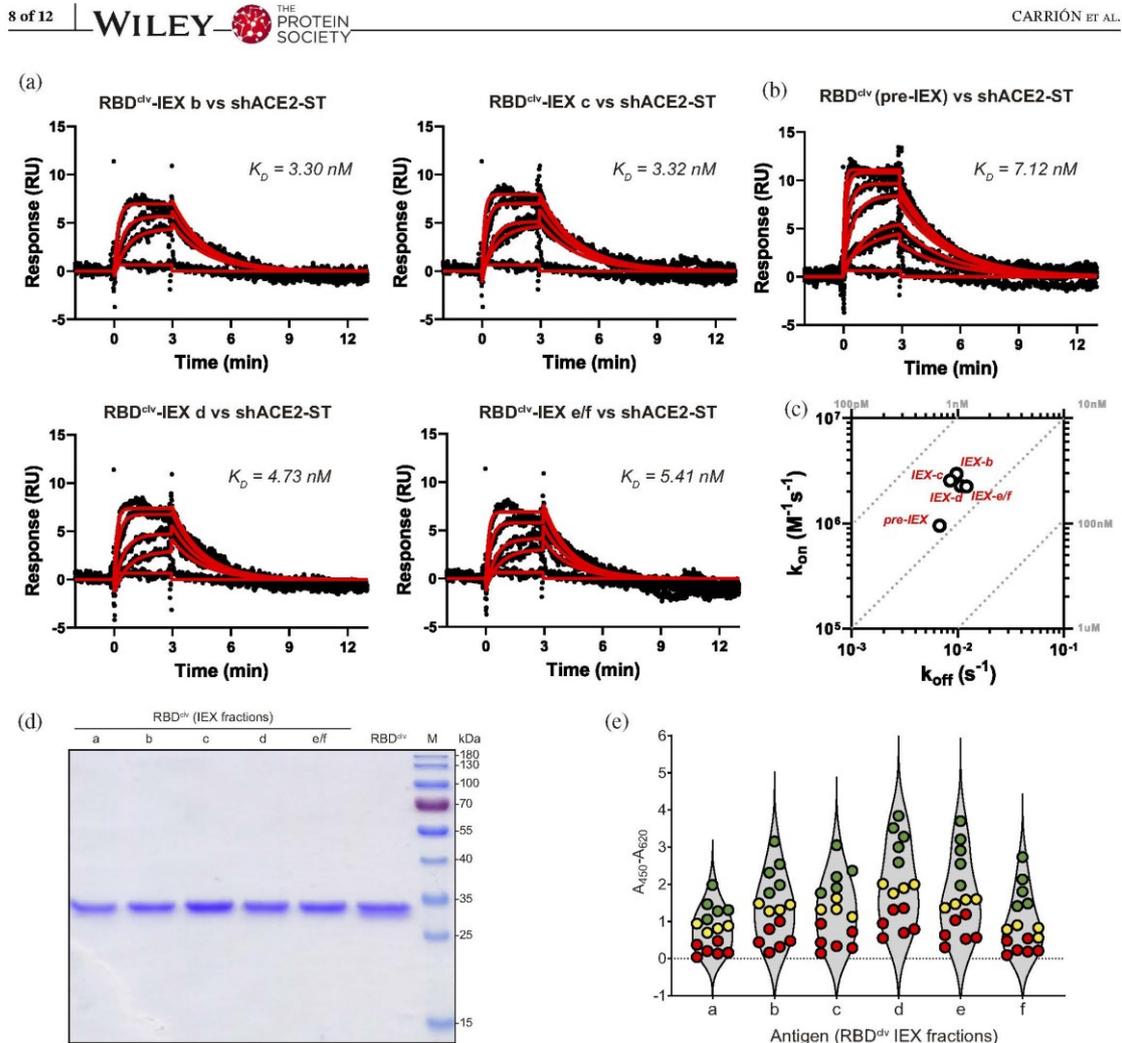
Finally, we immobilized RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions in multi-well ELISA plates and analyzed their antigenicity with a variable set of SARS-CoV-2 positive sera. Despite not ruling out differences in response due to protein stability upon immobilization, our results demonstrate that all RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions show antigenicity with comparable results (Figure 6e).



**FIGURE 5** Effect of RBD N-glycosylation on binding with serum antibodies and shACE2. (a) SPR binding analysis of serum antibodies from 16 vaccinated individuals (identified with numbers 1–16) with captured RBD-ST (green bars) and <sup>deg</sup>RBD-ST (orange bars). SPR response was calculated as the average SPR signal between 1 and 1.5 min of dissociation. (b) SPR binding analysis between shACE2<sup>clv</sup> injected on captured RBD-ST (left) and <sup>deg</sup>RBD-ST (right). (c) SPR binding analysis between <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup> injected on captured RBD-ST (left) and <sup>deg</sup>RBD-ST (right). All SPR experiments were conducted in parallel using the same analyte injection.  $K_D$  values shown in each panel were obtained after fitting to a Langmuir 1:1 model (red traces).

## 3 | CONCLUSIONS

Our work is among the first to describe a cost-effective single pipeline to produce soluble versions of the SARS-CoV-2 RBD and the peptidase domain of human ACE2 using *Drosophila* S2 cells. We show they are produced with high yields, as stable and functional proteins containing or not Strep-tag. Furthermore, we found that RBD shows micro-heterogeneity due to glycosylation and variable negative charges. However, its effect on binding with ACE2 and specific antibodies is negligible,



**FIGURE 6** Effect of negative charges micro-heterogeneity of RBD on binding with shACE2 and serum antibodies. (a) SPR binding analysis of captured shACE2-ST with RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions and (b) control RBD<sup>clv</sup> (pre-IEX). Poorly resolved e and f fractions were pooled and named e/f. All sensorgrams were fitted to a 1:1 Langmuir model (red traces) with the respective  $K_D$  values in each panel. (c) Comparison between kinetic parameters obtained by SPR in A and B, with dotted gray lines delimitating iso-affinity zones. (d) Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions after buffer exchange, protein concentration, and quantification. (e) Violin-plot of an ELISA achieved with a set of SARS-CoV-2 positive sera from infected individuals, using different RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions as antigens. For clarity, individual serum samples were arbitrarily stratified and classified with a three-color code, according to absorbance results obtained with RBD<sup>clv</sup>-IEX d fraction (<1.5 are shown in red, between 1.5 and 2.5 are shown in yellow, and >2.5 are shown in green).

positioning our system as a reliable alternative to approach the virus–cell interface in vitro.

Since our work is restricted to RBD from the ancestral Wuhan variant, additional studies should be done with other VOCs in the future. Moreover, shACE2 PTMs associated with S2 cells should also be studied to characterize our system fully. Finally, as we cannot thoroughly explain the origin of charges micro-heterogeneity in RBD, we encourage researchers to assess other expression

systems and native viral proteins or immunogen formulations, looking for charges micro-heterogeneity and its effect on RBD function.

Given the results obtained in this paper, we propose RBD/shACE2 expressed in S2 cells to be used in sVNT, which can be applied in the context of limited access to BSL3, granting sovereignty in decisions making on the administration of new SARS-CoV-2 booster doses, facing each country's particular situation. Additionally, our

biophysical and biochemical characterization of proteins expressed in S2 cells strongly supports their suitability for the aforementioned applications.

## 4 | MATERIALS AND METHODS

### 4.1 | DNA constructs

DNA sequences coding for amino acids 319–541 of SARS-CoV-2 (Wuhan) spike glycoprotein (GenBank: MN908947.3) and 18–615 of hACE2 (GenBank: BAB40370.1), both fused to a C-terminal enterokinase cleavage site followed by a Twin-Strep-tag<sup>®</sup> (IBA) and a STOP codon, were optimized for *Drosophila* codon usage and synthesized by Genscript. Synthetic genes were cloned into a pMT/V5-His expression vector (Invitrogen) immediately after the BiP sequence as previously described (Krey et al., 2010; Figure 1a).

### 4.2 | Protein production

S2 stable cell lines expressing RBD-ST and shACE2-ST were obtained as described before (Rammauro et al., 2022) by co-transfection with the respective expression vector and pCoPuro selection plasmid using Effectedene reagent (QIAGEN). Transfected cells were selected at 28°C in Insect Xpress medium (LONZA) added with 6 µg/mL puromycin. Stable S2 cell lines were grown in glass flasks at 28°C with 110 rpm agitation in standard orbital shaker and induced at  $5 \times 10^6$  cells/mL with 5 µM CdCl<sub>2</sub>. After 4 days of induction, cells were harvested by centrifugation at 150g for 5 min, and both proteins were purified from the culture supernatant by AC. For this, the supernatant was centrifuged at 6.000g, filtered through 0.22 µm and loaded in a 5 mL Strep-Tactin<sup>®</sup>XT 4Flow<sup>®</sup> columns (IBA), following the manufacturer's recommendations.

Strep-tag was removed by incubating overnight with Enterokinase-His (Genscript) (20 U mg<sup>-1</sup>), followed by overnight dialysis in 0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.15 M NaCl, incubation with Ni-Sepharose<sup>®</sup> (Cytiva) for 2 h and finally subjected to a second AC step in 0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA (storage buffer).

Finally, recombinant proteins were subjected to SEC in storage buffer, using Superdex 75 and 200 columns (Cytiva) for RBD-ST/RBD<sup>clv</sup> and shACE2-ST/shACE2<sup>clv</sup>, respectively.

### 4.3 | Protein analysis in solution

Purified proteins were submitted to 12% SDS-PAGE (with 0.1 M DTT when required) and further analyzed by

standard Coomassie staining or western blot using Strep-Tactin-HRP (IBA) according to the manufacturer's recommendations. In addition, two-dimensional electrophoresis was carried out as before (Lima et al., 2011) using 100 µg of RBD<sup>clv</sup> and <sup>deg</sup>RBD<sup>clv</sup>.

The hydrodynamic radius ( $R_H$ ) was analyzed by DLS in a Zetasizer Nano S (Malvern). Measurements were done in quintuplicate using quartz cuvettes at 25°C.

The thermostability of recombinant proteins was assessed by nanoDSF in a Prometheus NT.48 (Nanotemper). Unfolding and refolding  $T_m$  values were obtained upon sequential heating and cooling at 1°C/min between 20 and 90°C. When required, samples were incubated in 8000-fold excess of DTT (21–68 mM) for 1 h at 25°C.

### 4.4 | N-deglycosylation

N-deglycosylation was achieved under native conditions by incubating 200 µg of recombinant protein with 1000 U of PNGaseF (NEB) at 25°C overnight or under denaturant conditions at 37°C for 1 h following the recommendations of the manufacturer.

### 4.5 | Ion exchange chromatography

Purified proteins were buffer exchanged to 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl using PD-10 desalting columns (Cytiva), loaded onto a Mono Q<sup>™</sup> 5/50 column (Cytiva) equilibrated in the same buffer for ion exchange chromatography (IEX). Then, they eluted with 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl in a 40 CVs gradient.

### 4.6 | Mass spectrometry analyses

#### 4.6.1 | Sample preparation

Sample preparation for MS was achieved with soluble proteins or bands from Coomassie-stained SDS-PAGE. When required, an initial reduction/alkylation step was conducted, as previously reported (Rivera et al., 2020). Sample preparation from SDS-PAGE bands for MALDI-TOF/TOF was done as before (Rossello et al., 2017), while for proteins in solution, tryptic peptides were obtained and desalted using C18 OMIX tips (Agilent). For MALDI-TOF/TOF, elution was performed on a plate, and for LC-MS/MS, eluates were vacuum-dried and resuspended in 0.1% formic acid as previously described (Olivero-Deibe et al., 2021).

#### 4.6.2 | MALDI-TOF/TOF

Tryptic peptides were analyzed using a 4800 MALDI-TOF/TOF (Abi Sciex). Spectra were acquired in reflector mode, and MS/MS analysis was performed for selected ions. Proteins were identified by database searching NCBI (20160821) using MASCOT search engine (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>) and the following parameters: monoisotopic mass tolerance, 0.03 Da; fragment mass tolerance, 0.5 Da; methionine oxidation as variable modifications, and cysteine carbamidomethylation as fixed modification (when corresponds). In addition, unassigned intense signals were fragmented for manual interpretation of N-glycosylation.

#### 4.6.3 | LC-MS/MS analysis

Tryptic peptides were subjected to LC-MS/MS as before (Olivero-Deibe et al., 2021) using a gradient from 0% to 35% of mobile phase B over 90 min, and mass analysis was performed in a data-dependent mode using a top 12 method (Rivera et al., 2020). Database searches were performed using a *D. melanogaster* target-decoy database containing RBD sequence from Uniprot (June 2020) using PatternLab V (Santos et al., 2022). Searching parameters are listed in Supporting Information tables, and peptide spectrum matches were filtered to reach FDR  $\leq 1\%$  at the protein level.

#### 4.6.4 | Isothermal titration calorimetry

ITC was done on a VP-ITC (Malvern Panalytical) by titrating 10  $\mu\text{M}$  shACE2-ST or shACE2<sup>clv</sup> with 150  $\mu\text{M}$  RBD<sup>clv</sup> or RBD-ST, respectively, in storage buffer at 25°C. Data analysis and fitting to a hetero-association model were done as before (Medeiros et al., 2020).

#### 4.6.5 | Surface plasmon resonance

SPR experiments were done at 25°C and flowrate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  using a Biacore 3000, with 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) P20 as running buffer, and CM5 sensorchips (Cytiva) previously coated with Twin-Strep-tag<sup>®</sup> Capture Kit (IBA), according to recommendations of the manufacturer. All sensorgrams were double-referenced and analyzed with BIAevaluation software v4.1.

Binding analyses were done by capturing shACE2-ST (at densities between 44 and 88 RUs) and injecting RBD<sup>clv</sup> in triplicates at 2-fold increasing concentrations from 3 to 192 nM. In addition, the glycosylation effect on

binding was assayed by capturing RBD-ST (or <sup>deg</sup>RBD-ST) at densities of 35 and 25 RUs, respectively, and injecting shACE2<sup>clv</sup> (or <sup>deg</sup>shACE2<sup>clv</sup>) at 2-fold increasing concentrations from 12.5 to 50 nM.

The effect of RBD deglycosylation on binding with serum antibodies was assessed by SPR analysis as before (Rammauro et al., 2022), capturing RBD-ST and <sup>deg</sup>RBD-ST at final densities of 46 and 52 RUs in two parallel surfaces and injecting 1:50 dilutions of sera from individuals who received a three doses heterologous vaccination scheme (two doses of CoronaVac + booster with BNT162b).

The effect of RBD negative charges microheterogeneity on binding with shACE2-ST was evaluated by capturing ligand densities of 50 RUs and injecting RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions (b, c, d, and e/f) at concentrations of 5, 10, 25, and 50 nM. Control experiments with pre-IEX RBD<sup>clv</sup> were done identically with additional 100 and 200 nM injections.

#### 4.6.6 | Cell-surface binding assay

Assays were done as previously described (Pallesen et al., 2017) with adaptations. Briefly,  $1 \times 10^5$  HEK293T and HEK293T-hACE2 (NR-52511, BEI Resources, NIAID, NIH) cells were incubated on ice for 1 h with different amounts of RBD-ST (0.15–100 ng) and subsequently stained with 1:400 Strep-Tactin-Dye 649 (IBA). Cells were immediately acquired using an Accuri C6 (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc.). Unstained cells were used as a control of the fluorescence background.

#### 4.6.7 | ELISA

ELISA was done as previously described (Rammauro et al., 2022) using plates coated with 200 ng of RBD<sup>clv</sup> or RBD<sup>clv</sup>-IEX fractions and incubated with 1:100 dilutions of negative (pre-pandemic), positive (SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR), or vaccinated (two doses of CoronaVac + booster with BNT162b) human sera. Competition ELISA was done with plates coated with variable amounts of RBD<sup>clv</sup> (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 micrograms per well) and incubated for 1 h at RT with a pre-mix of variable concentrations of shACE2-ST (0, 6, 12, and 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and human sera diluted 1:20 in PBS. After washing with PBS + 0.2% Tween 20, plates were incubated with Strep-Tactin-HRP (IBA) diluted 1:1,000 and developed with TMB liquid substrate (Sigma).

This study was approved by the ethical institutional review board (MSP\_956220-CEI\_001-2021). Informed consent was obtained from all participants.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work. The following reagents were obtained through BEI Resources, NIAID, and NIH: Human Embryonic Kidney Cells (HEK-293T) Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2, HEK-293 T-hACE2 Cell Line, NR-52511.

## FUNDING INFORMATION

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (FOCEM, grant number COF03/11) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, grant number FMV\_3\_2022\_1\_172395).

## ORCID

Federico Carrión  <https://orcid.org/0000-0003-4092-2168>

## REFERENCES

- Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*. 2020;26:1033–6.
- Bagdonaite I, Thompson AJ, Wang X, Søgaard M, Fougereux C, Frank M, et al. Site-specific O-glycosylation analysis of SARS-CoV-2 spike protein produced in insect and human cells. *Viruses*. 2021;13:551.
- Callaway E. New omicron-specific vaccines offer similar protection to existing boosters. *Nature*. 2022;609:232–3.
- Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, Hjorth CK, Dommer AC, Harbison AM, et al. Beyond shielding: the roles of Glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Cent Sci*. 2020;6:1722–34.
- Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, Walsh SR, Essink B, Brosz A, et al. A bivalent omicron-containing booster vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2022;387:1279–91. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2208343>
- Creutzmacher R, Maass T, Veselkova B, Ssebyatika G, Krey T, Empting M, et al. NMR experiments provide insights into ligand-binding to the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain. *J Am Chem Soc*. 2022;144:13060–5. Available from: <http://n2t.net/addgene:154754>
- Eldrid CFS, Allen JD, Newby ML, Crispin M. Suppression of O-linked glycosylation of the SARS-CoV-2 spike by quaternary structural restraints. *Anal Chem*. 2021;93:14392–400.
- Glasgow A, Glasgow J, Limonta D, Solomon P, Lui I, Zhang Y, et al. Engineered ACE2 receptor traps potently neutralize SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:28046–55.
- Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev*. 2022;310:6–26.
- Grishin AM, Dolgova NV, Landreth S, Fisetete O, Pickering IJ, George GN, et al. Disulfide bonds play a critical role in the structure and function of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike antigen. *J Mol Biol*. 2022;434:167357.
- Gstöttner C, Zhang T, Resemann A, Ruben S, Pengelley S, Suckau D, et al. Structural and functional characterization of SARS-CoV-2 RBD domains produced in mammalian cells. *Anal Chem*. 2021;93:6839–47.
- Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus–insect cell expression system and engineering of insect cells to produce “Mammalianized” recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*. 2006;68:159–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706680056>
- Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell*. 2022;185:447–456.e11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421014951>
- Kabadi PG, Sankaran K, Palanivelu DV, Adhikary L, Khedkar A, Chatterjee a mass spectrometry based mechanistic insights into formation of Tris conjugates: implications on protein biopharmaceutics. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016;27:1677–85.
- Korn J, Schäckermann D, Kirmann T, Bertoglio F, Steinke S, Heisig J, et al. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep*. 2020;10:21393.
- Kozlik P, Goldman R, Sanda M. Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis*. 2017;38:2193–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elps.201600547>
- Krey T, D'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000762 Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000762>
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581:215–20.
- Li L, Honda-Okubo Y, Baldwin J, Bowen R, Bielefeldt-Ohmann H, Petrovsky N. Covax-19/Spikogen® vaccine based on recombinant spike protein extracellular domain with Advax-CpG55.2 adjuvant provides single dose protection against SARS-CoV-2 infection in hamsters. *Vaccine*. 2022;40:3182–92.
- Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9:2076–90.
- Lima A, Durán R, Schujman GE, Marchissio MJ, Portela MM, Obal G, et al. Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen listeria monocytogenes: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J Proteomics*. 2011;74:1720–34.
- Liu H, Zhang Q, Wei P, Chen Z, Aviszus K, Yang J, et al. The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Res*. 2021;31:720–2.
- Lorenzo R, Defelipe LA, Aliperti L, Niebling S, Custódio TF, Löw C, et al. Deamidation drives molecular aging of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding motif. *J Biol Chem*. 2021;279:101175 Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925821009777/fulltext>
- Maffei M, Montemiglio LC, Vitagliano G, Fedele L, Sellathurai S, Bucci F, et al. The nuts and bolts of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain heterologous expression. *Biomolecules*. 2021;11:1812.
- Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M, Hasell J, Appel C, et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat Hum*

- Behav. 2021;5:947–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41562-021-01122-8>
- Medeiros A, Benítez D, Korn RS, Ferreira VC, Barrera E, Carrión F, et al. Mechanistic and biological characterisation of novel N 5-substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in *Leishmania*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35:1345–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ienz20>
- Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. *Front Immunol*. 2022;12:1–21. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.809244/full>
- Olivero-Deibe N, Tomé-Poderti L, Carrión F, Bianchi S, Fló M, Prieto D, et al. Expression, purification, and characterization of bovine leukemia virus-like particles produced in *Drosophila* S2 cells. *Frontiers in Virology*. 2021;1:756559.
- Pallesen J, Wang N, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfer RN, Turner HL, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E7348–57. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1707304114>
- Pascuale CA, Varese A, Ojeda DS, Pasinovich ME, Lopez L, Rossi AH, et al. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous immunization against SARS CoV-2 using sputnik V, ChAdOx1-S, BBIBP-CorV, Ad5-nCoV, and mRNA-1273. *Cell Rep Med*. 2022;3:100706 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666379122002488>
- Planas D, Saunders N, Maes P, Guivel-Benhassine F, Planchais C, Buchrieser J, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 omicron to antibody neutralization. *Nature*. 2022;602:671–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04389-z>
- Prévost J, Richard J, Gasser R, Ding S, Fage C, Anand SP, et al. Impact of temperature on the affinity of SARS-CoV-2 spike glycoprotein for host ACE2. *J Biol Chem*. 2021;297:101151 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925821009522>
- Rammauro F, Carrión F, Olivero-Deibe N, Fló M, Ferreira A, Pritsch O, et al. Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2. *Vaccine*. 2022;40:5189–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X22009112>
- Rivera B, Leyva A, Portela MM, Moratorio G, Moreno P, Durán R, et al. Quantitative proteomic dataset from oro- and nasopharyngeal swabs used for COVID-19 diagnosis: detection of viral proteins and host's biological processes altered by the infection. *Data Brief*. 2020;32:106121.
- Rossello J, Lima A, Gil M, Duarte JR, Correa A, Carvalho PC, et al. The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism. *Sci Rep*. 2017;7:1–4.
- Sanda M, Morrison L, Goldman R. N- and O-glycosylation of the SARS-CoV-2 spike protein. *Anal Chem*. 2021;93:2003–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c03173>
- Santos MDM, Lima DB, Fischer JSG, Clasen MA, Kurt LU, Camillo-Andrade AC, et al. Simple, efficient and thorough shotgun proteomic analysis with PatternLab V. *Nature Protocols*. 2022;17:1553–78. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-022-00690-x>
- Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020;30:981–8.
- Shi Y, Zeida A, Edwards CE, Mallory ML, Sastre S, Machado MR, et al. Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119:e2120419119 Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2120419119>
- Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci*. 2022;31:e4300.
- Sullivan E, Sung PY, Wu W, Berry N, Kempster S, Ferguson D, et al. SARS-CoV-2 virus-like particles produced by a single recombinant Baculovirus generate anti-S antibody and protect against variant challenge. *Viruses*. 2022;14:914.
- Sun Z, Ren K, Zhang X, Chen J, Jiang Z, Jiang J, et al. Mass spectrometry analysis of newly emerging coronavirus HCoV-19 spike protein and human ACE2 reveals camouflaging Glycans and unique post-translational modifications. *Engineering*. 2020;7:1441–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32904601/>
- Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MI-C, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol*. 2020;38:1073–8.
- Tripathi NK, Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:420.
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369:330–3.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265–9.
- Zhao P, Praissman JL, Grant OC, Cai Y, Xiao T, Rosenbalm KE, et al. Virus-receptor interactions of glycosylated SARS-CoV-2 spike and human ACE2 receptor. *Cell Host Microbe*. 2020;28:586–601.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312820304571>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Carrión F, Rammauro F, Olivero-Deibe N, Fló M, Portela MM, Lima A, et al. Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface. *Protein Science*. 2023;32(8):e4721. <https://doi.org/10.1002/pro.4721>

## PUBLICACIÓN 2

Rammauro, F., Carrión, F et al. (2022) Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2. *Vaccine* 40, 5189–5196.

*Vaccine* 40 (2022) 5189–5196



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)



## Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2



Florencia Rammauro<sup>a,b,1</sup>, Federico Carrión<sup>b,1</sup>, Natalia Olivero-Deibe<sup>b</sup>, Martín Fló<sup>a,b</sup>, Ana Ferreira<sup>c,d</sup>, Otto Pritsch<sup>a,b</sup>, Sergio Bianchi<sup>e,f,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>Unidad de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup>Área Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>e</sup>Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>f</sup>Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 March 2022

Received in revised form 6 July 2022

Accepted 19 July 2022

Available online 27 July 2022

#### Keywords:

SARS-CoV-2

Heterologous vaccination

Humoral immune response

Binding kinetics

Fc-mediated functions

### ABSTRACT

**Background:** Vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has proven to be a successful strategy for prevent severe infections. CoronaVac and BNT162b2 are the most used vaccines worldwide, but their use in heterologous vaccination schedules is still subjected to evaluation. **Methods:** Fifty healthy individuals who received heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 were enrolled in a post-vaccination serological follow-up longitudinal prospective study. We evaluated specific serum anti-receptor binding domain (RBD) IgG antibody levels, and their capacity to block RBD-ACE2 interaction with a surrogate neutralization assay. In 20 participants, we assessed antibody binding kinetics by surface plasmon resonance, and Fc-mediated functions by ADCC and ADCP reporter assays.

**Results:** Our baseline seronegative cohort, displayed seroconversion after two doses of CoronaVac and an important decrease in serum anti-RBD IgG antibodies levels 80 days post-second dose. These levels increased significantly early after the third dose with BNT162b2, but 73 days after the booster we found a new fall. Immunoglobulin functionalities showed a similar behavior.

**Conclusions:** The heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 generated an impressive increase in serum anti-RBD specific antibody levels followed by a drop. Nevertheless, these titers remained well above those found in individuals only vaccinated with CoronaVac in the same elapsed time. Serum IgG levels showed high correlation with antibody binding analysis, their capacity to block RBD-ACE2 interaction, and Fc-effectors mechanisms. Our work sheds light on the humoral immune response to heterologous vaccination with CoronaVac and BNT162b2, to define a post-vaccination correlate of protection against SARS-CoV-2 infection and to discuss the scheduling of future vaccine boosters in general population.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The application of effective vaccines against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has proved to be a successful strategy for reducing viral transmission and disease burden. The two most used vaccines worldwide are CoronaVac (Sinovac Life Sciences, Beijing, China), an inactivated SARS-CoV-2 based

platform with more than 1.7 billion administered doses, and BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), a mRNA-based vaccine with more than 1.5 billion doses [1].

In March 2020, the first cases of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) were diagnosed in Uruguay. By February 24, 2022, of a 3.5 million population more than 830.000 confirmed cases of SARS-CoV-2 infection have been reported and more than 6.900 persons have died [2]. In February 2021, the Ministry of Public Health of Uruguay authorized the emergency use of CoronaVac [3] (600 SU of inactivated virus per dose) and BNT162b2 [4] (30 µg per dose) vaccines in two doses administrated 28 days apart. To date, 77% of the Uruguayan population has been vacci-

\* Corresponding author at: Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Av. Italia s/n, 11600 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: [sbianchi@fmed.edu.uy](mailto:sbianchi@fmed.edu.uy) (S. Bianchi).

<sup>1</sup> Equal contribution as first author.

nated with two doses of some of these two vaccines (59.9% received CoronaVac and 38.4% BNT162b2) [2], while only 1.7% was immunized with AstraZeneca vaccine provided by the COVAX initiative (<https://vacuna.uy>).

Both CoronaVac and BNT162b2 have shown great efficacy to prevent hospitalizations two weeks after second dose (2D) administration [5,6], simultaneously with the detection of high levels of serum specific antibodies against the SARS-CoV-2 Spike protein [7]. Although immunological parameters required to define a post-vaccination correlate of protection (CoP) against SARS-CoV-2 infection are still under discussion, antibody-mediated viral neutralization has been considered one of the most important contributors [8], along with other antibody-mediated functions like Fc-mediated effector responses [9]. Some studies found that inactivated SARS-CoV-2 vaccines generates lower levels of neutralizing antibodies [1] and a decline over time in the level of specific antibodies has been reported for both, BNT162b2 [10,11] and CoronaVac vaccines [12].

Faced with this reality, the application of booster doses has become a strategic alternative that must coexist with the demand for a global equitable distribution of vaccines. In this regard, in September 2021 the Ministry of Public Health of Uruguay authorized the administration of a booster dose with BNT162b2 for the subset of the population fully vaccinated with CoronaVac. Nowadays, almost 52% of Uruguayan population has already received this booster.

Here, we analyzed the dynamics of serum IgG antibodies against the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike protein at different times, in a longitudinal prospective study on healthy individuals. We quantified the specific IgG levels in participants who received a two-dose plan of CoronaVac, and after heterologous BNT162b2 third dose (3D) administration. In addition, we analyzed the functionality of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies by measuring their neutralizing capacity, Fc-mediated effector functions, and their overall binding kinetics to the RBD. Regarding the measurement of the neutralizing capacity, we must point out that we used an *in vitro* assay that evidences the blockage of the interaction between the RBD protein and its receptor (ACE2) by specific anti-RBD antibodies, as an accessible experimental approach to address their neutralizing capacity. There is little information regarding the use of a 3D booster with BNT162b2 on fully vaccinated individuals with 2 doses of CoronaVac [13,14]. Our work provides new data that help to understand the development and characterization of the humoral immune response against this combination of heterologous vaccines.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cohort and study design

Fifty individuals, 60% women, median age 40 years (IQR 30–50) belonging to the staff of the Institut Pasteur de Montevideo, who underwent voluntary heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2, were enrolled in a post-vaccination serological follow-up study. Serum samples were collected at five times: before vaccination ( $t_0$ ); after a median follow-up of 18 days (IQR 16–23) post-2D ( $t_1$ ); 80 days (IQR 78–82) post-2D ( $t_2$ ); 18 days (IQR 16–20) post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ); and finally, 73 days (IQR 72–81) post-3D (for 41 of 50 participants) ( $t_4$ ). All participants declared not to have been diagnosed with COVID-19 prior to or during the development of the study, in two questionnaires performed at  $t_0$  and at  $t_3$ . In addition, local and systemic adverse events within 7 days after 3D were registered. This study was done in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association and was approved by the ethical institutional review

board (MSP 956,220 – CEI 001-2021). Informed consent was obtained from all participants.

### 2.2. ELISA, neutralization activity, surface plasmon resonance (SPR), and antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis (ADCC and ADCP) assays

Anti-RBD (Wuhan variant) IgG serum levels were quantified using COVID-19 IgG QUANT ELISA Kit (developed by Universidad de la República, Institut Pasteur de Montevideo and ATGen SRL), according to manufacturer's instructions. Results were expressed in binding antibody units per milliliter (BAU/mL), by using the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (NIBSC code: 20/136) for assay calibration (<https://www.nibsc.org/documents/jifu/20-136.pdf>).

The blockade of RBD-ACE2 interaction by specific anti-SARS-CoV-2 antibodies was analyzed by using an *in vitro* surrogate virus neutralization test (sVNT; cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit, GenScript®) in serum from individuals who received heterologous vaccination at  $t_1$  and  $t_2$  (post-2D with CoronaVac) and at  $t_3$  and  $t_4$  (post-3D with BNT162b2), according to manufacturer's instructions. Briefly, recombinant RBD conjugated to HRP was pre incubated with different dilutions of serum samples and then added to ACE2 coated ELISA microplates to analyze the capacity of specific serum antibodies to inhibit RBD-ACE2 interaction. A calibrator serum (Cat. No. A02087, GenScript®) of 1,000,000 Arbitrary Units per milliliter (AU/mL) was used according to manufacturer's instructions to generate a standard curve by serially diluting the calibrator serum from 600 AU/mL to 9.37 AU/mL. The optical densities of serum dilutions measured at 450 nm that fall in the lineal range of the standard curve were used to interpolate a semiquantitative titer value in AU/mL, which were corrected with the corresponding dilution factor to calculate the final value in AU/mL of serum.

SPR assays were conducted with serum samples obtained at four different times ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ) from a sub-group of 20 individuals who received heterologous CoronaVac/BNT162b2 vaccination, to evaluate the binding of total specific antibodies against captured RBD on a SPR sensorchip. A recombinant RBD expressed in S2 insect cells was used for these assays (see [Supplementary Material](#) for details, Fig. S1).

ADCC and ADCP were performed on the same 20 serum samples at  $t_1$  and  $t_3$ , using ADCC and ADCP reporter assays (InvivoGen) according to manufacturer's instructions with minor differences. Jurkat-Lucia™ NFAT cells expressing human FcγRIIIA V158 allotype or human FcγRIIA H131 allotype were used for ADCC and ADCP reporter assays, respectively (see [Supplementary Material](#) for details).

### 2.3. Data analysis

By employing GraphPad Prism 9.2.0.332 we carried out comparisons between groups using Friedman's test and Dunnett's multiple comparison post-hoc test or Wilcoxon test. Although the non-parametric tests used in the multiple comparisons generally yielded significant differences in all the contrasts used, in some cases, the post-hoc comparisons were marginally significant, essentially because of the low number of observations. To overcome this difficulty, we used linear mixed models (R packages "lme4" and "emmeans") with Tukey correction on the logarithm of the concentrations, modeling the individual as a random effect. Prior to this, we verified the normality and homoscedasticity assumptions through the Shapiro-Wilks test and the studentized Breusch-Pagan test, respectively. In all cases, the post-hoc contrasts were highly significant ( $p$ -value  $< 1 \times 10^{-6}$ ). Results from reporter bioassays were obtained in relative luminescence unit

(RLUs) and expressed as endpoint titers. To assess consistency in the level of specific antibodies measured by ELISA and SPR, we calculated two-tailed Pearson correlation coefficients with a 95% confidence interval.

### 3. Results

Early after receiving the 3D of BNT162b2, all individuals reported only mild to moderate adverse events. Injection site pain was by far the most frequent (90%), followed by fatigue, malaise, and chills among other local and systemic adverse events (Table 1).

No specific anti-RBD IgG antibodies were found before vaccination ( $t_0$ ) in the serum samples (baseline seronegative). In contrast, all participants displayed seroconversion 18 days post-2D of CoronaVac ( $t_1$ ), with a median of 403 BAU/mL (IQR 249–618) (Fig. 1). At  $t_2$  all 50 individuals remained seropositive, although with an important decrease in the level of anti-RBD IgG antibodies (median of 113 BAU/mL, IQR 61–193) (Fig. 1). Interestingly, a significant increase of serum anti-RBD IgG antibodies was evidenced after 18 days post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ), reaching a median of 8877 BAU/mL (IQR 6076–13081) (Fig. 1). Finally, after a median of 73 days post-3D ( $t_4$ ) the level of specific anti-RBD IgG antibodies in 41 individuals of our cohort decreased again but towards a median of 2622 BAU/mL (IQR 1907–5100) (Fig. 1). Despite individual differences, all participants showed the same trend in terms of IgG levels (Fig. 2A). In addition, we observed a concomitant evolution in blocking capacity of RBD-ACE2 interaction in participants who received a heterologous CoronaVac/BNT162b2 vaccination. We detected a drop between  $t_1$  and  $t_2$  [median of 3413 AU/mL (IQR 2250–5301) vs. 1064 AU/mL (IQR 554–1968), respectively], an important improvement early post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ), and recurrently a reduction between  $t_3$  and  $t_4$  [median of 65,221 AU/mL (IQR 40701–109618) vs. 20,480 AU/mL (IQR 12079–32878), respectively] (Fig. 2B). According to the sVNT kit specifications, the neutralization titer can be interpreted as low (<15000 AU/mL), medium (1500–5000 AU/mL) and high (>5000). Besides, these blocking capacities linearly correlates with anti-RBD IgG levels at each time point (Fig. S2).

To evaluate kinetics of binding that could evidence differences in the maturation of humoral response, we selected 20 individuals who received heterologous vaccine scheme and analyzed the response based on total antibodies by SPR. All individuals surpassed the values obtained with pre immunization serum samples (Figs. 3A and S3) and dissociation proved to be extremely slow, causing that the level of bound antibodies remained almost constant for more than 10 min. By virtue of this, we could not obtain kinetics parameters and registered the level of bound antibodies (in RUs) after 1 min of dissociation, as an arbitrary measurement of the level of total bound anti-RBD antibodies. The values obtained at  $t_2$  exhibited a decline with respect to  $t_1$ , showing a temporal drop in the level of total circulating specific antibodies. Results obtained 18 days post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ) resulted in a sharp increase in the level of total specific antibodies (Fig. 3A). Again, this behavior is in concordance with results obtained by ELISA (Fig. 3B) showing a strong correlation between IgG and total specific antibodies shortly after doses administration (Fig. S4).

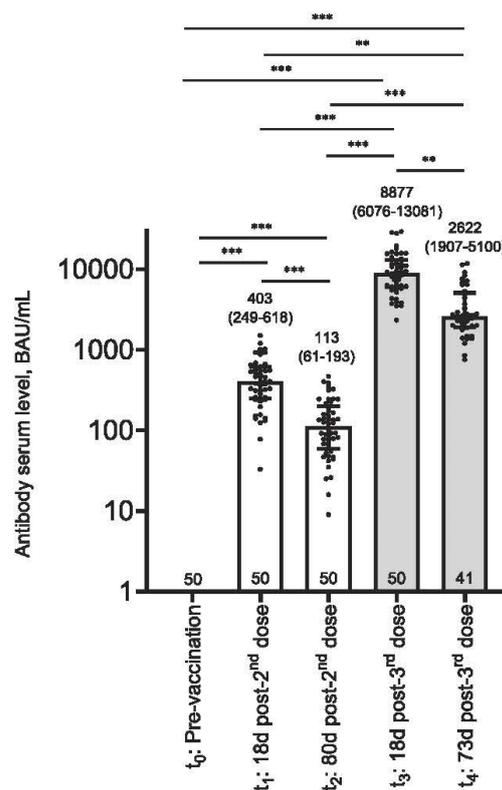
Beyond virus recognition and neutralization by antibodies, Fc-mediated effector functions (like ADCC and ADCP) have been linked to protection against multiple pathogens [15], including SARS-CoV-2 vaccination in animal models [16]. To advance our knowledge on this, we performed *in vitro* ADCC and ADCP reporter assays on serum samples from 20 participants collected 18 days post-2D with CoronaVac ( $t_1$ ) and 18 days post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ). We found that BNT162b2 booster also increased the ADCC

**Table 1**

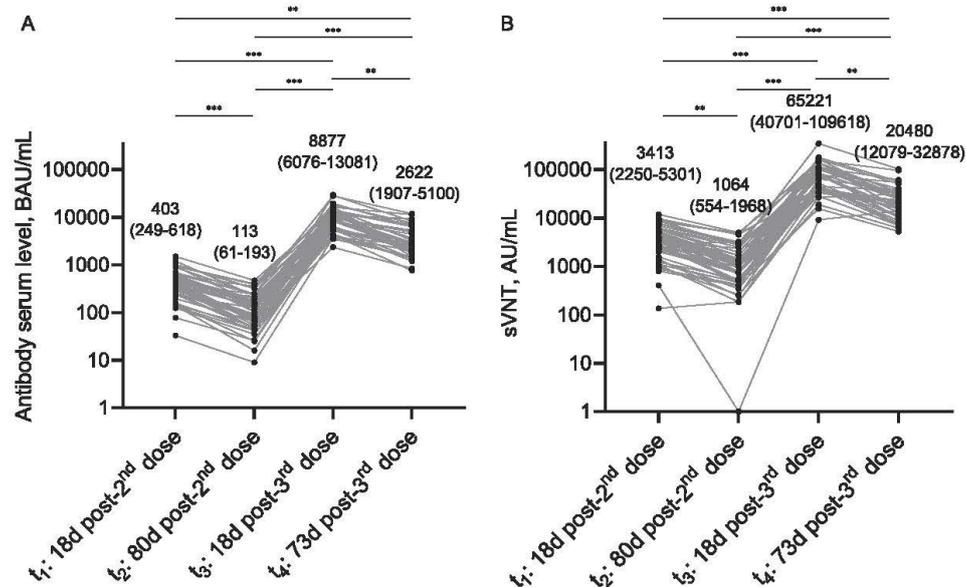
Adverse events after third dose with BNT162b2.

|                         |                            | Participants (%) |
|-------------------------|----------------------------|------------------|
| Local adverse events    | Pain                       | 45 (90)          |
|                         | Swelling                   | 4 (8)            |
|                         | Skin redness               | 2 (4)            |
|                         | Regional lymphadenopathy   | 1 (2)            |
| Systemic adverse events | Fatigue                    | 16 (32)          |
|                         | Malaise                    | 12 (24)          |
|                         | Chills                     | 10 (20)          |
|                         | Headache                   | 8 (16)           |
|                         | Myalgia                    | 8 (16)           |
|                         | Fever                      | 5 (10)           |
|                         | Arthralgia                 | 4 (8)            |
|                         | Nausea, vomiting, diarrhea | 4 (8)            |

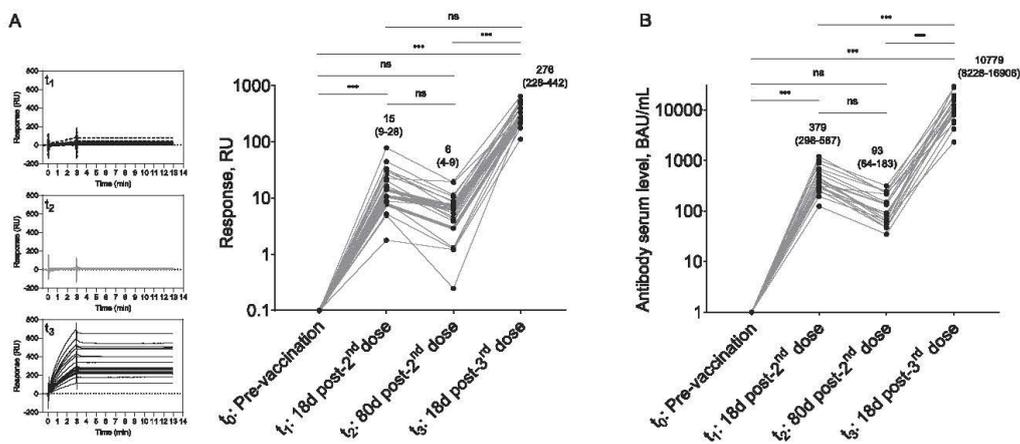
The questionnaire was conducted concomitantly to the blood extraction early after 3D with BNT162b2 by medical staff, and adverse events are classified as local or systemic signs or symptoms. All but two participants presented at least one of the evaluated events, and many of them presented more than one. The table shows the number of participants with the specific sign or symptom and the respective percentage within the cohort (%).



**Fig. 1. Serum anti-RBD IgG levels at different times in the cohort follow-up.** Serum samples of the same 50 individuals that received heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 were evaluated at different times, except for  $t_4$  where 41 of them were studied. Bars and numbers above them represent the median values of each time point and numbers in parentheses are the interquartile ranges. The number of individuals evaluated at each time point is presented on the base of each bar. Bars corresponding to serum samples obtained after the third dose are presented in grey. Comparisons between groups were carried out using Friedman's test and Dunn's multiple comparison post-hoc test. \*\*p = 0.01–0.001, \*\*\*p < 0.001. BAU, binding antibody units.



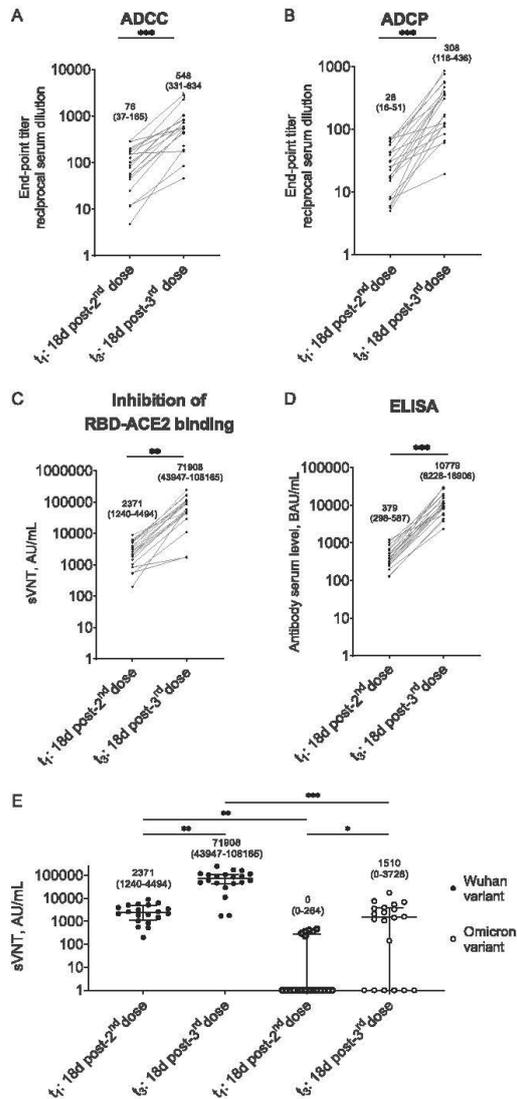
**Fig. 2.** Comparison between serum anti-RBD Ig levels and their capacity to block RBD-ACE2 interaction at different times in the cohort follow-up. Lines show the individual evolution over time of the serum anti-RBD Ig levels (A) and their capacity to block RBD-ACE2 interaction (B) for every participant in the cohort ( $n = 50$ ). Numbers represents median values with the interquartile range in parentheses. Both datasets show a similar behavior over time in most of the evaluated cases. Comparisons between groups were carried out using Friedman's test and Dunn's multiple comparison post-hoc test. \*\*  $p = 0.01-0.001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . BAU, binding antibody units; AU, arbitrary units.



**Fig. 3.** Comparison of anti-RBD total antibodies measured by SPR and anti-RBD Ig measured by ELISA, in serum samples of 20 individuals selected from the cohort and collected at different times. The levels of total specific antibodies measured by SPR after 1 min dissociation are presented at different times with grey lines showing the individual evolution over time, and the corresponding sensorgrams as stacked insets on the left (A). Sensorgrams are presented after subtracting pre-vaccination data collected at  $t_0$  and for clarity, curves are presented with the same color code as in Fig. S5. For comparison, the results obtained by ELISA with the same 20 selected individuals are presented (B) with the same representation as in Fig. 2. Both in SPR and ELISA, pre-vaccination data (at  $t_0$ ) correspond to zero (not shown due to logarithmic representation of y-axis). RU, resonance units; BAU, binding antibody units.

titer from a median of 76 (IQR 37-165) to 548 (IQR 331-834) (Fig. 4A), and ADCP titer from a median of 28 (IQR 16-51) to 308 (IQR 116-436) (Fig. 4B). The same behavior was shown for blocking capacity of RBD-ACE2 interaction (Fig. 4C) and binding to RBD (Fig. 4D) at  $t_1$  and  $t_3$ . Considering the relevance of Omicron outbreak in our country, we decided to compare the blocking capacity

of antibodies developed against SARS-CoV-2 Wuhan and Omicron variants, by performing svNT with these same 20 sera. We found a clear reduced activity against the Omicron variant at both times, post-2D [median of Wuhan variant, 2371 AU/mL (IQR 1240-4494)] vs. median of Omicron variant, 0 AU/mL (IQR 0-264)] and post-3D [median of Wuhan variant, 71,908 AU/mL (IQR 43947-108165), vs.



**Fig. 4.** Fc-mediated functions and RBD-ACE2 binding inhibition of specific serum anti-RBD immunoglobulins. Figure shows ADCC (A) and ADCP (B) Fc-mediated functions of serum anti-RBD immunoglobulin in 20 individuals early after two doses of Coronavac ( $t_1$ ) and after heterologous booster with BNT162b2 ( $t_2$ ). Endpoint titers were calculated by interpolating the reciprocal of serum dilutions to baseline, whose values were determined for each plate as the mean signal in absence of serum plus three standard deviations. Inhibition of RBD-ACE2 binding (C) and serum anti-RBD IgG levels (D) were measured in the same samples, showing a similar behavior over time. Comparison of the RBD-ACE2 binding inhibition activity against SARS-CoV-2 Wuhan and Omicron variants were carried out by sVNT in these 20 samples (E). Numbers represents median values and the interquartile range (in parentheses). Comparisons between groups were carried out using Wilcoxon test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.01-0.001$ , \*\*\* $p < 0.001$ . BAU, binding antibody units; AU, arbitrary units.

median of Omicron variant, 1510 AU/mL (IQR 0-3728)]. However, the *in vitro* blocking capacity of RBD-ACE2 interaction showed an increase after booster for both variants, especially for Wuhan one (Fig. 4E).

#### 4. Discussion

Safety and efficacy of BNT162b2 and CoronaVac vaccines have been previously reported [5,17,18], and some studies have directly compared CoronaVac and BNT162b2 vaccines performances [19,20]. In fact, our group has recently evaluated the humoral response to these vaccines in solid organ transplant recipients [21,22]. Moreover, in a small number of individuals immunized with BNT162b2, we found similar results when comparing both vaccines over time (Fig. S5). At present, one of the major topics of discussion is the use of vaccine boosters [23,24], especially heterologous vaccination approaches. In this regard, noteworthy results have recently been published which focuses on heterologous priming with adenoviral-vectored vaccines followed by boosting with mRNA [25,26] or recombinant protein-based vaccines [27], or viral-vectored vaccine booster after two doses of inactivated vaccine [28]. Information regarding the dynamics of antibody response induced by heterologous prime-boost vaccination with inactivated-virus and mRNA vaccines remains scarce, especially in the medium-term post-booster [13,14,29]. Moreover, studies which focuses on functional characteristics of antibodies generated by heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 are still hard to find.

Our baseline seronegative cohort showed seroconversion 18 days post-2D with CoronaVac, but the level of specific antibodies dropped significantly 80 days post-2D (almost 72%), similarly to the decay overtime reported following the administration of BNT162b2 [10,30] or CoronaVac [12,31] vaccines. However, 18 days post-3D with BNT162b2 vaccine, we found an impressive 22-fold increase in serum specific antibody levels if compared with the same period post-2D with CoronaVac. Indeed, the level of antibodies detected in these individuals were almost three times higher than those reached by individuals fully vaccinated with two doses of BNT162b2 (Fig. S5). Our results are in agreement with recent reports analyzing populations that received the prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 [13,32], as well as with other 3D schedules, by using either homologous [33] or heterologous [34] schemes.

To assess the evolution of specific antibody levels after heterologous booster we compared results obtained 73 days post-3D ( $t_4$ ) with those obtained at  $t_3$  and found a drop of 70% considering median values of each time, similarly to that seen in a comparable span of time post-2D with CoronaVac (between  $t_1$  and  $t_2$ ). Despite this, the antibody levels at  $t_4$  remained 23-fold higher as compared to levels obtained from participants fully vaccinated with CoronaVac at 80 days post-2D. To the best of our knowledge this is the first study to determine the magnitude of the decline over time in serum specific antibody levels after heterologous vaccination with CoronaVac and BNT162b2 in a healthy population. These results are crucial in the definition of future boosting plans, especially regarding the time between them.

The dynamics of the capacity to block RBD-ACE2 interaction follows the same behavior as anti-RBD antibody levels, showing an important increase early post-3D with BNT162b2 ( $t_3$ ), followed by a new reduction measured 73 days post-3D ( $t_4$ ). Considering a similar period post-vaccination, the blocking of RBD-ACE2 interaction post-3D with BNT162b2 remained significantly higher than those observed post-2D with CoronaVac ( $t_3$  vs.  $t_1$ ). Despite the fall observed 73 days post-3D with BNT162b2, the blocking capacity remains almost 20-times higher when compared with that detected 80 days post-2D with CoronaVac ( $t_4$  vs.  $t_2$ ). Even more, blocking levels at  $t_4$  remained 6-times higher than those detected at  $t_1$ . sVNT results expressed in AU/mL are very useful for comparing variation between different individuals and over time. If we interpret the results expressed in AU/mL according to the technical specifications of the sVNT kit, we can summarize that the median

values of neutralization titers were medium at  $t_1$ , low at  $t_2$ , and high at  $t_3$  and  $t_4$ .

The reported dynamics of humoral response highlights the benefits of this heterologous vaccination scheme, considering that the level of serum neutralizing antibodies has been proposed as a highly predictive marker of immune protection for symptomatic SARS-CoV-2 infected patients [35]. Even more, in the context of the emergence of SARS-CoV-2 variants of concern, a higher neutralization capacity achieved by a booster vaccination, can generate an increased protection from severe infection outcomes [8,36]. However, we found a clear decline in the RBD-ACE2 interaction blocking capacity when we compare the Wuhan variant against the Omicron one, in agree with previous findings of Pérez-Then and col. [13]. Anyway, our results could provide valuable information regarding the temporal behavior of blocking capacity since a CoP for SARS-CoV-2 is crucial in the fight against pandemic [37].

To compare the performance of different vaccine schedules, we urgently need to define efficient methods that serve as CoP for COVID-19 vaccines. These CoPs will also allow assessing the individual and community levels of protection against SARS-CoV-2 infection. Recent studies have shown that antibody levels against the Spike protein and its neutralizing capacity strongly correlates with efficacy across different vaccine platforms [35,38,39]. The use of the WHO international standard and the expression of results in BAU/mL, allows its comparison between different laboratories. Recent works suggested an antibody level of approximately 260 BAU/mL as a correlate of protection in the general population [38] and cancer patients [40]. Although this level still needs to be confirmed by other studies, the possibility of having this type of information could be useful for future management of vaccination schedules.

Based on the complexity of the mechanisms associated with the maturation of the humoral response and the effect that different vaccines platforms could have on it, we analyzed differences in the binding kinetics of serum samples by SPR. As opposed to ELISA, where antibodies reach binding equilibrium, using SPR we obtained real-time binding data, allowing kinetic binding evaluation at the expense of a reduction in sensitivity. However, polyclonality and the unknown concentration of specific antibodies prevented us from extracting overall kinetics parameters that could help in elucidating changes associated with longitudinal maturation of humoral response. Even the “apparent  $k_{off}$ ” (which does not depend on free antibody concentration) could not be properly calculated, probably because of avidity and/or re-binding events of the different isotypes of antibodies which result in an extremely slow dissociation. This slow dissociation (whose differences between doses were inexistent or remained undetectable) is a qualitative feature of anti-RBD antibodies, being compatible with the presence of high affinity IgG produced by plasma cell that underwent the complex process of maturation through successive rounds of somatic hypermutation and selection. On the other hand, this feature of specific IgG antibodies likely favors their ability to trigger effector mechanisms *in vivo*. Interestingly, the level of specific IgG or total antibodies, measured respectively by ELISA and SPR, showed a similar temporal evolution and a strong correlation early after 2D and 3D (Fig. S4), evidencing the usefulness of both techniques to analyze the dynamics of humoral responses nearly vaccination.

While recent data points to the ability of SARS-CoV-2 mRNA vaccines to evoke robust Fc-effector functions [9], less is known about inactivated virus vaccines and heterologous vaccination. It has been reported that some Fc-dependent pathways of anti-SARS-CoV-2 specific antibodies potentially contribute to COVID-19 severity [41] and/or could play a role in combatting SARS-CoV-2 infections [42]. We determined that these Fc-mediated fea-

tures show strong correlation with IgG serum levels and blocking capacities, similarly to findings reported in convalescent individuals [43]. This suggests that Fc-mediated functions could be playing an important role in preventing SARS-CoV-2 infections or COVID-19 severity after vaccination, even against emerging virus variants. Moreover, according to our findings, binding of specific antibodies could represent an indirect measurement of Fc-mediated effector functions.

The findings of this study must be seen considering some limitations. The first is the sample size; although, we consider it important to have a five-point IgG levels follow-up, covering pre- and post-vaccination. The second limitation concerns the lack of CoronaVac-booster group; however, the Ministry of Public Health of Uruguay did not use CoronaVac as a booster option but only the BNT162b2 vaccine. For this reason, there are virtually no people with a third dose of CoronaVac in our country. Third, Uruguay lacks local access to biosafety level 3 (BSL3) facilities for achieving plaque reduction neutralization tests (PRNT), which is the gold standard for detecting and quantifying neutralizing antibodies (NABs). For this reason, we performed a surrogate neutralization test which clearly has limitations, such as the absence of biological membranes and other proteins or protein domains with a known role in the attachment, binding, and fusion processes of the virus with the host cell. Finally, data on T-cell responses induced during vaccination is a relevant issue to be considered.

## 5. Conclusion

In this work we provide new evidence regarding heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 in healthy individuals, showing the dynamic of the levels of specific antibody after approximately 2.5 months. A significant correlation between levels of anti-RBD antibodies, their RBD-ACE2 interaction blocking capacity, and ADCC or ADCP-effectors activities was found, supporting that inexpensive and easily implemented serological tests are important tools for monitoring the immune response after vaccination and define booster doses.

Inactivated virus-based vaccines are useful tools in the global fight against COVID-19, although more data are needed on its efficacy against emerging SARS-CoV-2 variants and on the durability of protection across different age groups, geographical settings and in the presence of comorbidities [44]. In addition, as mRNA-based platform vaccines have shown to be safe and effective over time [17], the use of a heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2 represents a promising and safe strategy.

### Authorship

All authors attest they meet the ICMJE criteria for authorship.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

We would like to thank all the participants who volunteered for this study at the Institut Pasteur de Montevideo. We especially thank Hugo Naya for his generous support during the preparation of this manuscript. The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work. To María Teresa Lamaison, Daniela Hirschfeld, and Finance and Purchases Unit members for their dedication and their diligent support during study execution.

## Funding

This work was supported by Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur [grant number COF 03/11]; Agencia Nacional de Investigación e Innovación; and Comisión Académica de Posgrado (CAP), Universidad de la República.

The funders did not play any role in the design and conduct of the study; collection, analysis, or interpretation of the data; preparation, approval, or decision to submit the manuscript for publication.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.023>.

## References

- Mallapaty S. China's COVID vaccines have been crucial - now immunity is waning. *Nature* 2021;598(7881):398–9. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02796-w>.
- Ritchie H, Mathieu E, Rodés-Guirao I, et al. Coronavirus pandemic (COVID-19). Our World in Data; 2020. <<https://ourworldindata.org/coronavirus>>.
- Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21(2):181–92.
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020;383(27):2603–15.
- Jara A, Undurraga EA, González C, Paredes F, Fontecilla T, Jara G, et al. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. *N Engl J Med* 2021;385(10):875–84.
- Tenforde MW, Patel MM, Ginde AA, et al. Effectiveness of SARS-CoV-2 mRNA vaccines for preventing covid-19 hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2021. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab687>.
- Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol* 2021;21(8):475–84. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00578-z>.
- Cromer D, Steain M, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe* 2022;3(1):e52–61.
- Tauzin A, Nayrac M, Benlarbi M, et al. A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host Microbe* 2021;29(7):1137–1150 e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.001>.
- Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning immune humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *N Engl J Med* 2021;385(24):e84.
- Kertes J, Gez SB, Saeiuk Y, Supino-Rosin I, Stein NS, Mizrahi-Reuveni M, et al. Effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine 6 months after vaccination among patients in large health maintenance organization, Israel. *Emerg Infect Dis* 2022;28(2):338–46.
- Cucunawangsih C, Wijaya RS, Lugito NPH, Suriapranata I. Antibody response to the inactivated SARS-CoV-2 vaccine among healthcare workers. *Indonesia. Int J Infect Dis* 2021;113:15–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.078>.
- Pérez-Then E, Lucas C, Monteiro VS, Miric M, Brache V, Cochon L, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination. *Nat Med* 2022;28(3):481–5.
- Cheng SMS, Mok CKP, Leung YWY, et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nat Med* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01704-z>.
- Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 2018;18(1):46–61. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.106>.
- Gorman MJ, Patel N, Guebre-Xabier M, Zhu AL, Atyeo C, Pullen KM, et al. Fab and Fc contribute to maximal protection against SARS-CoV-2 following NVX-CoV2373 subunit vaccine with Matrix-M vaccination. *Cell Rep Med* 2021;2(9):100405.
- Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine through 6 months. *N Engl J Med* 2021;385(19):1761–73.
- Dinc HO, Saltoglu N, Can G, Balkan II, Budak B, Ozbey D, et al. Inactive SARS-CoV-2 vaccine generates high antibody responses in healthcare workers with and without prior infection. *Vaccine* 2022;40(1):52–8.
- Lim WW, Mak L, Leung GM, Cowling BJ, Peiris M. Comparative immunogenicity of mRNA and inactivated vaccines against COVID-19. *Lancet Microbe* 2021;2(9):e423. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00177-4).
- Mok CKP, Cohen CA, Cheng SMS, et al. Comparison of the immunogenicity of BNT162b2 and CoronaVac COVID-19 vaccines in Hong Kong. *Respirology* 2021. <https://doi.org/10.1111/resp.14191>.
- Seija M, Rammauro F, Santiago J, Orihuela N, Zilberti C, Machado D, et al. Comparison of antibody response to SARS-CoV-2 after two doses of inactivated virus and BNT162b2 mRNA vaccines in kidney transplant. *Clin Kidney J* 2022;15(3):527–33.
- Prieto J, Rammauro F, López M, Rey R, Fernández A, Bianchi S, et al. Low Immunoglobulin G antibody levels against severe acute respiratory disease coronavirus 2 after 2-dose vaccination among liver transplantation recipients. *Liver Transpl* 2022;28(5):891–4.
- Krause PR, Fleming TR, Peto R, Longini IM, Figueroa JP, Sterne JAC, et al. Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. *Lancet* 2021;398(10308):1377–80.
- Callaway E. COVID vaccine boosters: the most important questions. *Nature* 2021;596(7871):178–80. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02158-6>.
- Schmidt T, Klemis V, Schub D, Mihm J, Hielscher F, Marx S, et al. Immunogenicity and reactivity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nat Med* 2021;27(9):1530–5.
- Normark J, Vikström L, Gwon Y-D, Persson I-L, Edin A, Björnsell T, et al. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA-1273 vaccination. *N Engl J Med* 2021;385(11):1049–51.
- Stuart ASV, Shaw RH, Liu X, Greenland M, Aley PK, Andrews NJ, et al. Immunogenicity, safety, and reactivity of heterologous COVID-19 primary vaccination incorporating mRNA, viral-vector, and protein-adjuvant vaccines in the UK (Com-COV2): a single-blind, randomised, phase 2, non-inferiority trial. *Lancet* 2022;399(10319):36–49.
- Yorsaeng R, Suntronwong N, Phowattanasathian H, Assawakosri S, Kanokudom S, Thongmee T, et al. Immunogenicity of a third dose viral-vector COVID-19 vaccine after receiving two-dose inactivated vaccines in healthy adults. *Vaccine* 2022;40(3):524–30.
- Costa Clemens SA, Weckx L, Clemens R, Almeida Mendes AV, Ramos Souza A, Silveira MBV, et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study. *Lancet* 2022;399(10324):521–9.
- Collier A-R, Yu J, McMahan K, Liu J, Chandrasekar A, Maron JS, et al. Differential kinetics of immune responses elicited by Covid-19 vaccines. *N Engl J Med* 2021;385(21):2010–2.
- Zeng G, Wu Q, Pan H, Li M, Yang J, Wang L, et al. Immunogenicity and safety of a third dose of CoronaVac, and immune persistence of a two-dose schedule, in healthy adults: interim results from two single-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 clinical trials. *Lancet Infect Dis* 2022;22(4):483–95.
- Assawasaksakul T, Sathitratanaheewin S, Vichaiwattana P, Wanlapakorn N, Poovorawan Y, Kittanamongkolchai W. Immunogenicity, safety and reactivity of a heterogeneous booster following the CoronaVac inactivated SARS-CoV-2 vaccine in patients with SLE: a case series. *RMD Open* 2021;7(3):e002019.
- Choi A, Koch M, Wu K, Chu L, Ma LingZhi, Hill A, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 variant mRNA vaccine boosters in healthy adults: an interim analysis. *Nat Med* 2021;27(11):2025–31.
- Munro APS, Janani L, Cornelius V, Aley PK, Babbage G, Baxter D, et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2021;398(10318):2258–76.
- Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27(7):1205–11.
- Hunsawong T, Fernandez S, Buathong R, Khadthasirama N, Rungrojchareonkit K, Lohachanakul J, et al. Limited and short-lasting virus neutralizing titers induced by inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *Emerg Infect Dis* 2021;27(12):3178–80.
- Krammer F. A correlate of protection for SARS-CoV-2 vaccines is urgently needed. *Nat Med* 2021;27(7):1147–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01432-4>.
- Feng S, Phillips DJ, White T, Sayal H, Aley PK, Bibi S, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27(11):2032–40.
- Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science* 2022;375(6576):43–50.
- Barrière J, Carles M, Audigier-Valette C, Re D, Adjoutah Z, Seitz-Polski B, et al. Third dose of anti-SARS-CoV-2 vaccine for patients with cancer: should humoral responses be monitored? A position article. *Eur J Cancer* 2022;162:182–93.
- Adeniji OS, Giron LB, Purwar M, Zilberstein NF, Kulkarni AJ, Shaikh MW, et al. COVID-19 severity is associated with differential antibody Fc-mediated innate immune functions. *mBio* 2021;12(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00281-21>.
- Diez JM, Romero C, Cruz M, et al. Anti-SARS-CoV-2 hyperimmune globulin demonstrates potent neutralization and antibody-dependent cellular

*F. Rammauro, F. Carrión, N. Olivero-Deibe et al.*

*Vaccine 40 (2022) 5189–5196*

- cytotoxicity and phagocytosis through N and S proteins. *J Infect Dis* 2021(2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab540>.
- [43] Butler SE, Crowley AR, Natarajan H, Xu S, Weiner JA, Bobak CA, et al. Distinct features and functions of systemic and mucosal humoral immunity among SARS-CoV-2 convalescent individuals. *Front Immunol* 2020;11:618685. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.618685>.
- [44] Ramasamy MN, Jessop IJ. CoronaVac: more data for regulators and policy makers. *Lancet* 2021;398(10296):186–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01543-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01543-9).

### 3. INFORMES DEL DLSP PARA LOS KITS SEROLÓGICOS DESARROLLADOS

#### INFORMES DLSP KIT "COVID-19 IgG ELISA UY 2.0"



Ministerio  
de Salud Pública  
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD  
DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

Montevideo, 05 de enero de 2021

Ha sido evaluado el reactivo "COVID-19 IgG ELISA UY 2.0" para la detección cualitativa de anticuerpos IgG, dirigidos contra el virus SARS-COV-2 en muestras clínicas de suero o plasma humano, elaborado y representado por ATGen S.R.L. (Uruguay)

Características del Reactivo

Lote estudiado: 922049 (Ref:9544)

Fecha de vencimiento: 01/12/2021

El reactivo fue sometido a control mediante el empleo de paneles de sueros (sueros de casos confirmados y de donantes sanos obtenidos en período pre-COVID 19).

#### RESULTADOS:

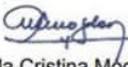
Los resultados se analizaron según intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la obtención de la muestra de sangre.

| IgG       | SENSIBILIDAD (IC95%)             |           |
|-----------|----------------------------------|-----------|
| 0-7 días  | < 80 %                           | NO CUMPLE |
| 8-14 días | 94.12 %<br>IC95% : 73.02%-98.95% | CUMPLE    |
| >14 días  | 97,67%<br>IC95% : 87.94%-99.59%  | CUMPLE    |

ESPECIFICIDAD: 96.15% (87.02%-98.94%)

El reactivo **CUMPLE** con los requisitos de especificidad y, en cuanto a la sensibilidad únicamente con muestras de sueros obtenidas con posterioridad a los 8 días de inicio de los síntomas.

  
Q.F. Ma Teresa Pérez Amaral  
Encargada Unidad Control de Calidad

  
Dra Ma Cristina Mógdasy  
Directora Departamento de Laboratorios

Av. Alfredo Navarro 3051 Instituto de Higiene acceso norte. CP 11600 Telf.  
1934 6240 email:consultasdlsp@msp.gub.uy



Ministerio  
de Salud Pública

DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD  
DIVISIÓN EPIDEMIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

NOTA: En el inserto que acompaña el kit, en el apartado "X) ESQUEMA DEL ENSAYO" en la columna "Volumen", donde dice 100ul diluyente + 10 ul muestra/control, debe decir : 100ul diluyente + 10 ul muestra, ya que los controles vienen prontos para usar, no deben diluirse. Se sugiere a su vez para evitar errores de interpretación del texto, afinar la redacción del punto "4." del apartado "IX) PROCEDIMIENTO".

## INFORME DLSP KIT “COVID-19 IgG QUANT ELISA”



Dirección General de la Salud  
Área de Vigilancia en Salud de la Población  
División Epidemiología  
Departamento de Laboratorios de Salud Pública

### INFORME

Montevideo, junio 2021

#### Informe de la evaluación realizada al kit reactivo COVID-19 IgG QUANT ELISA (Instituto Pasteur de Montevideo, ATGen, Universidad de la República Uruguay)

Ha sido evaluado el reactivo COVID-19 IgG QUANT ELISA para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG, dirigidos contra el virus SARS-COV-2 en muestras clínicas de suero o plasma humano, elaborado y representado por ATGen S.R.L. (Uruguay)

#### Características del Reactivo

Lote estudiado: 292122

Fecha de vencimiento: 04/2022

El reactivo fue sometido a control mediante el empleo de paneles de sueros de títulos bajos medios y altos de convalecientes de infección por SARS CoV 2.

Se evaluó la precisión analítica intradía e interdía con material de control positivo (5 replicados).

Las muestras se procesaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los resultados se analizaron según intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y la obtención de la muestra de sangre.

#### Sensibilidad:

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 8-14 días | 96,97 %<br>IC95% : 84,68%-99,46% |
| >14 días  | 100%<br>IC95% :87,13%-100%       |



Dirección General de la Salud  
Área de Vigilancia en Salud de la Población  
División Epidemiología  
Departamento de Laboratorios de Salud Pública

#### Evaluación de la precisión analítica:

- Coeficiente de Variación intradía : 5,41%
- Coeficiente de variación interdía: 18 %.

#### Observaciones

En relación al inserto que acompaña al kit :

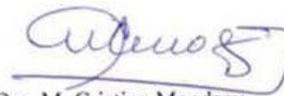
En el punto X : Interpretación de resultados, cuantitativo, no es clara la redacción del procedimiento a seguir cuando los valores obtenidos son inferiores al del calibrador con menor título.

En el punto XII: no se incluye las características del funcionamiento (cuantitativo)

Debido a que existen diferentes reactivos y plataformas para la cuantificación de anticuerpos anti SARS-CoV -2 se debería incorporar el aviso de que los valores de resultados obtenidos con distintos métodos pueden ser no comparables.



Dra. Rosario San Martín  
Directora Adjunta



Dra. M. Cristina Mogdasy  
Directora

# REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DE VENTA DE KITS SEROLÓGICOS POR PARTE DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

## REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DEL KIT "COVID-19 IgG ELISA UY 2.0"

|                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>REPUBLICA ORIENTAL<br/>DEL URUGUAY</p> <p>MINISTERIO<br/>DE SALUD PÚBLICA</p> |  <p>MSP</p> <p>Serie A 326942</p> <p><b>DIRECCION GENERAL DE LA SALUD</b><br/><b>DEPARTAMENTO DE EVALUACION DE TECNOLOGIA</b></p> <p><b>CERTIFICADO DE REGISTRO Y AUTORIZACION DE VENTA DE PRODUCTOS MEDICOS</b></p> <p>Certificado: 34569<br/>Validez: 12/03/2026</p> <p><b>Empresa:</b> ATGEN S.R.L.<br/><b>Director Técnico:</b> JUAN ANDRES ABIN CARRIQUIRY<br/><b>Familia:</b> A.3.1</p> <p><b>PRODUCTOS</b></p> <hr/> <p><b>N° Registro:</b> 76870<br/><b>Nombre Comercial:</b> ATGEN, COVID-19 IgG ELISA UY 2.0<br/><b>Fabricante:</b> ATGEN SRL<br/><b>Marca:</b> ATGEN<br/><b>Modelo:</b><br/><b>Cód. prod./N° Serie:</b> 9544</p> <p>Condición de Venta: SOLO para laboratorios clínicos.<br/>Para su comercialización el inserto en español debe estar acompañado por el informe emitido por el Departamento de Laboratorio de Salud Pública</p> <p><b>Nomenclator:</b> <input type="checkbox"/> Reactivos<br/><b>Clase de riesgo:</b> Clase III<br/><b>Países de Origen:</b> Uruguay<br/><b>Países de Procedencia:</b> Uruguay</p> <hr/> <p><br/>ING. RAFAEL ALONSO<br/>DIRECTOR<br/>Depto. Eval. Tecnología<br/>M.S.P.</p> <p>Montevideo, 12/03/2021</p> <p>Certificado: 34569</p> <p>Página: 1 de 1</p> <p>"LA LECHE MATERNA ES LA MEJOR PARA EL RECIEN NACIDO Y EL LACTANTE". LEY N° 17.803</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DEL KIT "COVID-19 IgG QUANT ELISA"

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

MSP

Serie A 338984

DIRECCION GENERAL DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE EVALUACION DE TECNOLOGIA

**CERTIFICADO DE REGISTRO Y AUTORIZACION DE VENTA DE PRODUCTOS MEDICOS**

Certificado: 35548  
Validez: 24/02/2022

**Empresa:** ATGEN S.R.L.  
**Director Técnico:** JUAN ANDRES ABIN CARRIQUIRY  
**Familia:** A.3.1

**PRODUCTOS**

**N° Registro:** 78176  
**Nombre Comercial:** ATGEN, COVID 19 IgG QUANT ELISA (COVID-19, anti-S)  
**Fabricante:** ATGEN SRL  
**Marca:** ATGEN  
**Modelo:** 9545  
**Cód. prod./N° Serie:** Condición de Venta: Solo para laboratorios clínicos.  
Para su comercialización el inserto en español debe estar acompañado por el informe emitido por el Departamento de Laboratorio de Salud Pública.

**Nomenclator:** Reactivos, para Inmunodiagnóstico  
**Clase de riesgo:** Clase III  
**Países de Origen:** Uruguay  
**Países de Procedencia:** Uruguay

*RODRIGO A. EL ALONSO*  
DIRECTOR  
Depto. Eval. Tecnología  
M.S.P.

Montevideo, 24/08/2021

Certificado: 35548

Página: 1 de 1

"LA LECHE MATERNA ES LA MEJOR PARA EL RECIEN NACIDO Y EL LACTANTE". LEY N° 17.803

---

*Página en blanco*