



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DE SARS-CoV-2  
BASADOS EN LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE  
DEL VIRUS DEL MOTEADO CLORÓTICO DEL  
CAUPÍ**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA:  
QFB. ALMENDÁREZ RODRÍGUEZ CLAUDIA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. SERGIO ROSALES MENDOZA**

**Co-DIRECTOR DE TESIS  
DR. MAURICIO COMAS GARCÍA**

**Con financiamiento de:**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto  
No. 321364

El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000588, en el Nivel Maestría (Consolidado).

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 1031199

**Proyecto realizado en:**

Laboratorio de Biofármacos del Centro de Investigación de Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Generación y evaluación de un prototipo de vacuna contra SARS-CoV-2 basado en pseudovirus por Claudia Almendárez Rodríguez se distribuye bajo una licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Índice de similitud  
21%

# **PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS QUIMÉ...**

**Por: CLAUDIA ALMENDÁREZ RODRÍGUEZ**

A partir de: 6 dic 2022 13:50:03  
8,742 words - 103 matches - 73 sources



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DE SARS-CoV-2  
BASADOS EN LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE  
DEL VIRUS DEL MOTEADO CLORÓTICO DEL  
CAUPÍ**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA:**

**QFB. ALMENDÁREZ RODRÍGUEZ CLAUDIA**

**SINODALES:**

**PRESIDENTE:**

**DR. SERGIO ROSALES MENDOZA** \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:**

**DR. MAURICIO COMAS GARCÍA** \_\_\_\_\_

**VOCAL:**

**DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ** \_\_\_\_\_

**DRA. DIANA PATRICIA PORTALES PÉREZ** \_\_\_\_\_



**UASLP**  
Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
**CIENCIAS DE LA SALUD  
Y BIOMEDICINA**

San Luis Potosí, S.L.P.  
Diciembre 2, 2022

**Comité Académico del Posgrado  
En Ciencias en Bioprocesos  
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP  
Presente.\_**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría QFB. Claudia Almendárez Rodríguez, titulada - Producción y caracterización de antígenos quiméricos de SARS-CoV-2 basados en la proteína de la cápside del Virus del moteado clorótico del caupí- ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 15 de diciembre a las 12:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

---

Director: Dr. Sergio Rosales Mendoza

---

Dr. Mauricio Comas García  
Co-director

---

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez  
Profesora titular del PCBP

---

Dra. Diana Patricia Portales Pérez  
Profesora invitada del PCBP

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)

## **Agradecimientos Académicos**

Al Dr. Sergio Rosales por el conocimiento brindado, la paciencia y el tiempo invertido en el desarrollo de este proyecto, además de la confianza otorgada para formar parte de este trabajo y de su equipo de laboratorio.

Al Dr. Mauricio Comas por todo el conocimiento, tiempo, paciencia y motivación a lo largo de este proyecto. Gracias por las palabras brindadas, que nos motivan como alumnos, tanto de manera personal como académica.

A la Dra. Margarita Rodríguez y la Dra. Diana Portales, por asesorarme y brindarme sus aportaciones en este trabajo.

A la Dra. Dania Govea por la disposición de resolver dudas y apoyar en partes fundamentales del desarrollo práctico de este proyecto.

## **Agradecimientos Personales**

A mi mamita, que, gracias a todo su esfuerzo, dedicación y valores, logro construir los cimientos que dieron pie para convertirme en la profesionista que ahora soy. Te amo.

A mi hermana Lesly que es y será siempre, lo más bonito que exista en mi vida. Gracias por ser la motivación que necesito para lograr mis metas. Cuido mis pasos, porque sé que tu los sigues. Te amo con todo mi ser.

A mi gran amigo Eloy, que fue de los pilares más fuertes en esta etapa. Tu motivación, acciones y confianza no tienen comparación.

A Noe Ávila, porque sin darte cuenta, siempre me brindaste las palabras correctas y me demostraste que todo es cuestión de decisión.

A mis ángeles de 4 patas en la tierra (Lucas, Duquesa y Magnus), porque sus miradas, juegos y travesuras son mi motor de cada día. Be the person your dog thinks you are.

Y sobre todo a Dios, por brindarme una segunda oportunidad, y estar el día de hoy logrando este sueño, contigo todo lo puedo.

## RESUMEN

La pandemia de COVID-19 ha puesto de relieve la necesidad de nuevas plataformas de vacunas para contar con soluciones expeditas contra los patógenos emergentes. En particular, algunos virus de plantas ofrecen diversas ventajas para desarrollar vacunas de subunidades, tales como: altas tasas de expresión en *E. coli*, el cual es un hospedero conveniente para la producción de biofármacos; alta inmunogenicidad y seguridad; así como ausencia de preinmunidad que podría interferir con la eficacia de la vacuna. El virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) es un sistema modelo que se ha caracterizado ampliamente, con ventajas clave para su uso como portador de epítopes. En el presente estudio, se insertaron genéticamente tres epítopes relevantes de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en la proteína de la cápside (CP) del CCMV y se expresaron en *E. coli*, lo que dio como resultado las quimeras CCMV1, CCMV2 y CCMV3. Las quimeras de CP recombinantes se purificaron a partir de los cuerpos de inclusión y se replegaron; para posteriormente evaluar su inmunogenicidad en ratones BALB/c. Las tres quimeras indujeron títulos altos de anticuerpos IgG dirigidos contra la proteína S recombinante. Este estudio sugiere que la CP de CCMV es un acarreador atractivo para el diseño de vacunas contra el SARS-CoV-2. Las VLPs ensambladas a partir de estas proteínas quiméricas podrían dar como resultado antígenos de alta eficacia para combatir al COVID-19.

**Palabras clave:** Proteína quimérica; Respuesta humoral; Acarreador de antígeno.

## ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has highlighted the need for new vaccine platforms to rapidly develop solutions against emerging pathogens. In particular, some plant viruses offer several advantages for developing subunit vaccines, such as high expression rates in *E. coli*, high immunogenicity and safety, and absence of pre-immunity that could interfere with the vaccine's efficacy. Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) is a model system that has been extensively characterized, with key advantages for its use as an epitope carrier. In the present study, three relevant epitopes from the SARS-CoV-2 Spike protein were genetically inserted into the CCMV CP and expressed in *E. coli* cultures, resulting in the CCMV1, CCMV2, and CCMV3 chimeras. The recombinant CP mutants were purified from the formed

inclusion bodies and refolded, and their immunogenicity as a subunit vaccine was assessed in BALB/c mice. The three mutants are immunogenic as they induce high IgG antibody titers that recognize the recombinant full-length S protein. This study supports the application of CCMV CP as an attractive carrier for the clinical evaluation of vaccine candidates against SARS-CoV-2. Furthermore, it suggests that VLPs assembled from these chimeric proteins could result in antigens with better immunogenicity.

**Keywords:** Chimeric protein; Humoral response; Antigen carrier.

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	3
2.1 Diseño de plásmidos .....	3
2.2 Predicción de la estructura de las proteínas quiméricas .....	4
2.3 Transformación de <i>E. coli</i> y ensayos preliminares de la expresión de proteínas quiméricas.....	4
2.4 Extracción de proteínas y análisis SDS-PAGE .....	5
2.5 Purificación de quimeras CCMV .....	5
2.6 Western blot .....	6
2.7 Ensayo de inmunización .....	7
2.8 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) .....	7
2.9 Análisis estadístico .....	8
3.0 RESULTADOS .....	8
3.1 Las quimeras basadas en CCMV que portan epítopes de la proteína S se expresan eficientemente en <i>E. coli</i> . .....	8
3.2 Los CP quiméricos son reconocidos por anticuerpos contra el RBD .....	9
3.3 Las quimeras CCMV1-3 inducen respuestas humorales en ratones .....	10
4. DISCUSIÓN .....	11
BIBLIOGRAFÍA .....	17
Reseña del artículo: Production and characterization of chimeric SARS-CoV-2 antigens based on the capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus .....	21
ANEXO: Artículo enviado a revista indexada .....	22

## 1. INTRODUCCIÓN

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2) es el agente etiológico de la Enfermedad Coronavirus 19 (COVID-19) y tuvo su origen en la provincia de Wuhan, China, en el año 2019 [1]. El COVID-19 rápidamente impactó negativamente la salud pública a nivel mundial, interrumpió la economía global y casi todas las actividades sociales [2]. No obstante, esta pandemia ayudó a desarrollar nuevas plataformas y tecnologías de vacunas que parecían estar lejos de ser aprobadas para fines de salud humana [3]. En particular, el desarrollo de vacunas es el enfoque más eficaz para combatir esta pandemia, por lo que se emprendió el desarrollo acelerado y sin precedentes de varios candidatos vacunales.

La inducción de anticuerpos neutralizantes y de respuestas de células T son marcadores de inmunoprotección contra el SARS-CoV-2, siendo la proteína Spike (S) el blanco principal. Con base en estudios realizados con SARS-CoV y MERS-CoV, se identificó rápidamente que el "Dominio de unión al receptor" (RBD) en el dominio S1 de la proteína S es el sitio principal para la inducción de anticuerpos neutralizantes [4].

Los coronavirus tienen el genoma más estable entre los virus de ARN monocatenario (ssRNA) [5]. Su tasa de mutación es mayor que la de los virus de ADN de doble cadena [6], pero menor que la de la mayoría de los virus ssRNA. Los coronavirus altamente patógenos pueden mutar para generar una serie de variantes de preocupación (VOC) del SARS-CoV-2. Los VOC se definen como aquellos que tienen cambios genéticos los cuales se predice o se sabe que afectan las características virales, como la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y la evasión del sistema inmune [7]. De entre todas las VOC, la OMS ha catalogado a la variante Delta (linaje B.1.617.2 y AY) y la variante Ómicron (linaje B.1.1.529 y BA) como las más preocupantes, dado que poseen mutaciones puntuales clave que ayudan al virus a escapar de los anticuerpos neutralizantes de los pacientes recuperados [8] y de las vacunas aprobadas.

Se han explorado varias plataformas para el desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2. En orden ascendente de frecuencia como tecnologías aprobadas, se encuentran las vacunas basadas en: subunidades proteicas, virus inactivados, ARNm encapsulado en liposomas y vectores adenovirales. Sin embargo, existen otras tecnologías en etapas preclínicas y clínicas, como partículas similares a virus, vectores virales replicantes y virus vivos atenuados [9].

Aunque la mayoría de las vacunas contra el SARS-CoV-2 se utilizan actualmente en todo el mundo bajo autorizaciones de uso de emergencia, es claro que se deben implementar nuevas plataformas para garantizar la vacunación global, así como una respuesta rápida frente a nuevas VOC, especialmente aquellas con capacidad de adquirir una mayor transmisibilidad y evasión inmune. Según la base de datos de la OMS, las vacunas de subunidades son las candidatas más destacadas en las evaluaciones clínicas. Estas vacunas tienen ventajas notables: no contienen ningún componente replicativo del patógeno que pueda causar una infección en caso de mala inactivación o reversión a la forma patogénica. Además, las vacunas de subunidades tienen el potencial de inducir una respuesta inmune dirigida preferentemente hacia los epítopes protectores, lo que en última instancia podría dar lugar al diseño racional de vacunas altamente eficaces [10]. Por otro lado, este tipo de vacunas induce en general una menor tasa de efectos secundarios. Sin embargo, al poseer una formulación simplificada en comparación con las vacunas que contienen al patógeno completo, con frecuencia resultan poco inmunogénicas, por lo que estas formulaciones a menudo se complementan con adyuvantes [11].

Los virus de plantas son vectores atractivos para la entrega de genes, fármacos y antígenos [12]. Entre todos los virus de plantas utilizados en biotecnología, el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) es probablemente uno de los virus de ARN más estudiados y la formación de VLPs se puede lograr *in vitro* a partir de la proteína de la cápside (CP) expresada de forma heteróloga [13]. Por un lado, puede ensamblarse en ausencia de ácidos nucleicos en una amplia gama de arreglos macromoleculares [14]. Además, puede empaquetar casi cualquier polímero flexible y cargado negativamente (*p.ej.*, oligos, ssRNA y polímeros). La CP del

CCMV es un acarreador de antígenos prometedor, por lo que puede ser la base para el diseño de vacunas epitópicas; varios estudios han demostrado su seguridad *in vivo* en distintos biomodelos [15] y se han explorado para otras aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos, en imagenología y la terapia tumoral [16]. La CP de CCMV recombinante se ha producido de manera eficiente en *E. coli* [17,18], lo que ha dado como resultado altos rendimientos que han respaldado su evaluación en estudios biofísicos, de nanotecnología y en aplicaciones biomédicas [19]. Este sistema ofrece la ventaja de que la CP puede modificarse genética y/o químicamente para exponer distintas moléculas, incluyendo el caso de epítopes, dando lugar a proteínas quiméricas que, en una forma dimérica o como un virión (vacío o lleno de ARN) puedan ser presentados al sistema inmune. Además, a diferencia de los vectores adenovirales, la CP de CCMV no impone limitaciones en cuanto a la inmunidad preexistente, dado que se trata de un virus vegetal cuyo reservorio no incluye a los humanos, por lo que los individuos vacunados carecen de anticuerpos anti-CP CCMV.

En el presente estudio, la CP de CCMV se modificó genéticamente para generar tres proteínas quiméricas que despliegan epítopes lineales de SARS-CoV-2. Dichas quimeras se expresaron en *E. coli* y se purificaron a partir de cuerpos de inclusión y se evaluó su inmunogenicidad en ratones BALB/c para determinar su potencial para en diseño de vacunas de subunidades contra el SARS-CoV-2.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño de plásmidos**

La proteína de la cápside (CP) de CCMV (Gene Bank: M28818.1A) se utilizó como andamio para desplegar los epítopes del SARS-CoV-2. Se diseñaron tres proteínas quiméricas para presentar los siguientes epítopes de la proteína SARS-CoV-2: CCMV1 (S<sub>462-500</sub>), CCMV2 (S<sub>505-522</sub>) y CCMV3 (S<sub>439-460</sub>); los cuales se insertaron entre los aminoácidos 164 y 165, es decir, en la lámina localizada entre  $\beta$ H- $\beta$ I. Los genes fueron optimizados para su expresión en *E. coli* y sintetizados por Gene Script, para posteriormente ser clonados en el vector pET-15b a través de los sitios

de restricción NdeI/BamHI. Las quimeras fueron fusionadas a una etiqueta His en el N- terminal.

## **2.2 Predicción de la estructura de las proteínas quiméricas**

El sitio de inserción de los epítopes del SARS-CoV-2 en la CP de CCMV se decidió modelando la proteína quimérica utilizando el motor de modelado ProMod3 del servidor de modelado de homología Swiss-Model (versión 1.0.0; <https://swissmodel.expasy.org>) usando la estructura del CP nativo de CCMV (PDB: 1za7.1) como plantilla. El sitio de inserción para obtener las quimeras se eligió de acuerdo con el que mostrara una menor modificación a la estructura terciaria de la proteína CP nativa. Este análisis se realizó con el programa de modelado molecular UCSF Chimera X.

## **2.3. Transformación de *E. coli* y ensayos preliminares de la expresión de proteínas quiméricas.**

Se transformaron células de *E. coli* Rosetta DE3 químicamente competentes con los vectores de expresión y se sembraron en placas de medio Luria Bertani (LB) suplementadas con ampicilina (50 mg/mL) y cloranfenicol (40 mg/mL). Se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron tres colonias al azar y se propagaron en medio LB con los antibióticos adecuados para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes. Se generó un preinóculo para cada una de las colonias seleccionadas en 50 mL de medio LB suplementado con 40 mg/mL de cloranfenicol y 50 mg/mL de ampicilina, seguido de incubación a 37 °C durante 24 h. Los inóculos se diluyeron 10 veces en un matraz que contenía medio 2YT (16 g/L de triptona bacteriológica, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, pH 7.0) suplementado con los antibióticos apropiados, y se procedió a cultivarlos a 37 °C hasta que la OD<sub>600nm</sub> alcanzara un valor entre 0.6-0.8, momento en el cual tomó una alícuota del cultivo como control negativo (pre-inducción). Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG (0.1 mM) y se incubó a 28 °C durante un período de 24 h. La biomasa fue colectada mediante centrifugación a 7000 RCF durante 15 min a 4 °C y fue almacenada a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

#### **2.4. Extracción de proteínas y análisis SDS-PAGE**

La biomasa recuperada del ensayo de expresión se descongeló y resuspendió en 2.5 ml de buffer de desensamblaje (imidazol 10 mM, NaCl 300 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM pH 8.0). Posteriormente, las células se lisaron mediante sonicación al 70 % de amplitud (Sonics Vibra Cell, CT, EE. UU.) en hielo durante un período de 10 min, que comprende 10 s de pulsos por 10 s de inactividad y se almacenó una alícuota para su posterior análisis (proteína total). El lisado se centrifugó a 7000 RCF durante 15 min y el sobrenadante (fracción soluble) se separó del sedimento (fracción insoluble). El sedimento se resuspendió en 2.5 ml de buffer de desensamblaje.

El perfil de expresión se determinó mediante SDS-PAGE. La fracción previa a la inducción, el extracto de proteína total y las fracciones de proteína soluble e insoluble se analizaron en gel SDS-PAGE al 12 %. Cada carril se cargó con 30 µL de la muestra correspondiente previamente mezclada con 5 µL de buffer de carga 5X y se hirvió durante 5 min a 98 °C. Los geles se corrieron a 120 V durante 1 h y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie.

#### **2.5. Purificación de quimeras CCMV**

Las colonias que mostraron el mejor perfil de expresión se usaron para expresar las proteínas de interés en 250 ml de LB con los antibióticos adecuados siguiendo las mismas condiciones de expresión iniciales (ver arriba). La biomasa se resuspendió en 4 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 y posteriormente se disgregó mediante sonicación a una amplitud del 70 % durante 1 min en hielo (10 pulsos s seguidos de períodos de 10 s de inactividad). El lisado se centrifugó durante 10 min a 7000 RCF y 4 °C. El sedimento se resuspendió en 3 ml de buffer de lavado en frío (2 M de urea, 20 mM de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl, Triton™ X-100 al 2 %, pH 8,0) y se sonicó como se describió anteriormente. La solución se centrifugó a 7000 RCF durante 10 min a 4 °C. El sedimento se lavó con el buffer desnaturizante y se centrifugó. El sedimento se resuspendió en un buffer que contenía 5 ml de Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, clorhidrato de guanidina 6 M y 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0. La solución se agitó con una barra magnética durante 60 min a

temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 7000 RCF. La proteína solubilizada se incubó con 1 ml de resina His Pur™ Ni-NTA durante 1 h a 4 °C con agitación constante en un agitador orbital. La muestra se centrifugó a 3600 RCF durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó para su posterior análisis. La resina Ni-NTA se lavó varias veces con 10 ml de buffer desnaturalizante (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, urea 6 M, pH 8,0). El replegamiento de la proteína se indujo mediante la aplicación de un gradiente lineal de urea (soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0 con un contenido de 6-0 M de urea). Cada lavado consistió en una incubación de 5 min con el buffer respectivo, seguida de un paso de centrifugación (5 min a 3600 RCF). La elución de las proteínas de interés se llevó a cabo lavando la resina con 1 ml de buffer que contenía imidazol 500 mM, NaCl 300 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 8.0. El paso de elución se repitió tres veces. El contenido de proteína en cada paso fue analizado por SDS-PAGE, como se indica en las secciones anteriores.

## **2.6. Western blot**

Los extractos de la proteína quimérica CCMV1 (alícuotas de 30 µL) se cargaron en un SDS-PAGE al 12 % y se corrieron tal como se mencionó anteriormente. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa BIO-RAD™ durante 1 h a 500 mA. La membrana se bloqueó durante toda la noche con una solución de leche descremada al 5 % a 4 °C, seguido de tres lavados de 10 min con PBS-Tween. El marcaje primario se realizó durante toda la noche a 4 °C utilizando un suero hiperinmune de borrego anti-S<sub>461 – 493</sub> (dilución 1:10,000) [20]. La membrana se sometió a tres lavados de 10 min con PBS-Tween antes de la adición de un anticuerpo anti-oveja conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:10,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) seguido de una incubación durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min con PBS-Tween, la membrana se trató con un sustrato quimioluminiscente de peroxidasa y se reveló en pantallas fotosensibles durante 15 min en una habitación oscura.

## **2.7. Ensayo de inmunización**

Se utilizaron ratones BALB/c, lo cual fue aprobado por el comité de ética de la FCQ-UASLP (No. de protocolo: CEID-2020-07R1). Los ratones tenían entre 8 y 10 semanas de edad y se dividieron al azar en nueve grupos (n = 4). Los ratones fueron sometidos a un esquema de inmunización que consistió en la administración de tres dosis subcutáneas (100 µL) en la espalda en los días 0, 14 y 21. Los grupos experimentales fueron: grupo 1 (PBS control negativo), grupo 2 (10 µg de CCMV1 en PBS), grupo 3 (10 µg de CCMV1 + Al(OH)<sub>3</sub>), grupo 4 (10 µg de CP CCMV), grupo 5 (10 µg de CCMV2 + PBS), grupo 6 (10 µg de CCMV2 + Al(OH)<sub>3</sub>), grupo 7 (10 µg de CCMV3 + PBS), grupo 8 (10 µg de CCMV3 + Al(OH)<sub>3</sub>), y grupo 9 (25 µg de CCMV1 + CCMV2 + CCMV3 + Al(OH)<sub>3</sub>). La toma de muestra sanguínea se realizó mediante una ligera incisión en la cola a los días 0, 13, 20, 39, 56 y 159. El suero se separó mediante centrifugación durante 10 min a 3600 RCF y se mantuvo a -20 °C hasta su posterior uso. El adyuvante utilizado fue Al(OH)<sub>3</sub> (G biosciences, No.de cat. 786-1215) en una proporción de 1:5.

## **2.8. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)**

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con los diferentes antígenos blanco: un péptido sintético que contenía los aminoácidos 461–493 de la proteína S de Wuhan, la proteína S recombinante de la secuencia de Wuhan (SinoBiological Inc. cat. No .40589-V08H4), la proteína S recombinante de la variante Delta (SinoBiological Inc. cat. No.40589-v08816) y las CP de CCMV quiméricas. Las placas se incubaron con la solución de antígeno durante 12 h a 4 °C (200 ng/pocillo para el péptido sintético; 50 ng/pocillo para las proteínas S y las CP del CCMV). El buffer de unión contenía Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 Mm y NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9.2. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween después de cada paso. La placa se bloqueó incubando con leche descremada al 5% durante 12 h a 4 °C. Se procedió a realizar diluciones de los sueros de prueba, los cuales se aplicaron en la placa la cual se incubó durante la noche a 4 °C. Como anticuerpo secundario, se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:10,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se utilizó una solución de sustrato ABTS que contiene 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) 0.6 mM (ABTS;

Sigma-Aldrich), ácido cítrico 0.1 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM a pH 4.0. Después de una incubación de 30 min a 25 °C, la OD<sub>405 nm</sub> se registró con un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MOM).

## 2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico comprendió ANOVA ( $p < 0,05$ ) ejecutado en el software STATISTICA (versión 10 de Stat Soft. Cía)

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Las quimeras basadas en CCMV que portan epítopes de la proteína S se expresan eficientemente en *E. coli*

Los epítopes del SARS-CoV-2 utilizados en el presente estudio se eligieron porque el RBD se considera un antígeno clave para la inducción de anticuerpos neutralizantes y respuestas de células T relevantes. La quimera CCMV1 (S<sub>462-500</sub>) contiene seis sitios de unión a ACE2 completos y uno parcial, que representan aproximadamente la mitad de los sitios de unión a ACE2 y, según el análisis *in silico*, un epítopo de células T de ayuda (Th) [21] y un epítopo de linfocitos T citotóxicos (CTL) [22]. La quimera CCMV2 (S<sub>505-522</sub>) contiene un sitio de unión a ACE2, mientras que la quimera CCMV3 (S<sub>439-460</sub>) contiene tres sitios de unión a ACE2, un epítopo de células Th y un epítopo de CTL. El sitio de inserción de los epítopes de SARS-CoV-2 en la secuencia de la CP de CCMV se propuso en el bucle más expuesto dentro de las láminas  $\beta$ . Para determinar si la inserción de los péptidos en dicho punto podría alterar por completo la estructura secundaria y terciaria de la CP, se modelaron las proteínas quiméricas usando el motor de modelado ProMod3. Se evaluaron varios sitios de inserción hasta que encontramos que la inserción de los epítopes entre los aminoácidos 164 y 165 de la CP tenía el menor impacto en la estructura. Es importante tener en cuenta que estas simulaciones no garantizan que las mutaciones no afectarán la estructura de la CP de CCMV, pero se usaron para determinar el sitio de inserción más probable de los tres bucles que preservan la integridad general de la proteína de la cápside.

La expresión de las quimeras basadas en la CP de CCMV se confirmó mediante SDS-PAGE, analizando tres clonas distintas para cada construcción. Todas las colonias analizadas mostraron la presencia de las proteínas recombinantes esperadas (22.1, 26.5, 24.2 y 24.8 kDa para WT, CCMV1, CCMV2 y CCMV3, respectivamente). En función de la cantidad relativa de proteína recombinante acumulada por cada clona, las siguientes se seleccionaron para realizar los experimentos posteriores: WT.1, CCMV 1.1, CCMV2.1, CP CCMV 3.3.

Las clonas seleccionadas se sometieron a experimentos de expresión a una escala de 200 mL para proceder a la purificación de las proteínas de interés. A pesar de utilizar diferentes protocolos de lisis y solubilización, todas las proteínas quiméricas permanecieron en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión). En contraste, la CP WT, se acumuló tanto en la fracción soluble como insoluble. Esta diferencia de solubilidades sugiere que la inserción de los epítopes del SARS-CoV-2 altera significativamente las propiedades fisicoquímicas y el plegamiento de la CP de CCMV. Por lo tanto, solubilizamos las proteínas quiméricas de los cuerpos de inclusión mediante el tratamiento con un buffer desnaturalizante. El protocolo implementado permitió una solubilización eficiente de los cuerpos de inclusión. Las CP de CCMV quiméricas y WT, tienen una etiqueta His N-terminal, por lo tanto, después de la solubilización de los cuerpos de inclusión, replegamos las proteínas después de su unión a la resina de Ni-NTA. Esto se hizo lavando la proteína unida con los buffers Tris-HCl que contenían imidazol, NaCl, 2-mercaptoetanol a pH 8 y aplicando un gradiente de urea de 6 a 0 M. Después del replegamiento de las proteínas, los buffers que contenían 20 y 250 mM de imidazol se utilizaron para lavar la resina y eluir la proteína débilmente unida. El buffer 500 mM de imidazol permitió una elución eficaz de la CP de CCMV quiméricas y WT, con alta pureza.

### **3.2 Los CP quiméricos son reconocidos por anticuerpos contra el RBD**

Con la finalidad de probar la antigenicidad de la quimera de CCMV1, se analizó mediante Western blot en el que el marcaje se realizó con un suero de borrego hiperinmune que reconoce una porción del RBD. El epítope en CCMV1 cae dentro de la región RBD utilizada para generar el suero hiperinmune [20]. El Western blot

mostró que el epítopo en CCMV1 puede ser reconocido por el suero hiperinmune específico de RBD, lo que confirma que la banda de interés observada por SDS-PAGE pertenece a la proteína quimérica, la cual es antigénica. Además, es bien sabido que, en solución, la CP de CCMV, se encuentra en una forma dimérica [24] y en condiciones desnaturalizantes, la mayoría de los dímeros se rompen. Sin embargo, en el Western blot, se logró detectar que una fracción de los dímeros de CP CCMV1, prevalecen bajo las condiciones desnaturalizantes de un SDS-PAGE. Existen antecedentes de que la dimerización de la CP de CCMV WT ocurre a través de la interacción directa entre los C-terminales de cada monómero [25]; por lo tanto, el resultado obtenido en este trabajo sugiere que la proteína replegada conserva al menos una parte de la estructura terciaria adecuada que le permite formar dímeros.

### **3.3 Las quimeras CCMV1-3 inducen respuestas humorales en ratones**

Es importante señalar que al menos durante el protocolo de inmunización, ninguno de los animales murió, ni presentó un comportamiento anormal, lo que sugiere que nuestros candidatos vacunales, hasta esta fase, son seguros. El ELISA indirecto realizado con los sueros del grupo 3 (dilución 1:800), para medir la respuesta de IgG de las muestras tomadas 18 días después de la tercera inmunización y cuyo antígeno diana era la proteína S de Wuhan, mostró los títulos de anticuerpos más altos en comparación con los demás grupos. Los grupos 8 y 9 (CCMV3 + adyuvante y CCMV1 + CCMV2 + CCMV3 + adyuvante, respectivamente) indujeron una respuesta humoral similar; sin embargo, con una potencia menor que la mostrada por el grupo 3 (CCMV1 + adyuvante). Esto sugiere que CCMV1 es el antígeno más prometedor en términos de inducir anticuerpos con una capacidad robusta para unirse a la proteína viral blanco. El título de anticuerpos IgG totales para el grupo 3 fue de 12,800.

Para ampliar la caracterización de las propiedades inmunogénicas CCMV1+ adyuvante, medimos los niveles relativos de las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) en el grupo G1 a G9; observándose un mayor nivel de IgG1 tanto en G3 como en G9, con una mayor respuesta en G3 en comparación con G9.

En los ELISA anteriores se usó la proteína S de Wuhan como antígeno; sin embargo, se exploró si un péptido sintético que cubriera 31 de los 38 aminoácidos que constituyen el epítipo SARS-CoV-2 en CCMV1 como antígeno permite detectar los anticuerpos generados por estos candidatos a vacunas. Para esto, se realizó un ELISA indirecto a diferentes diluciones de los sueros de los grupos G1, G2, G3 y G4, empleando como antígeno blanco el péptido sintético que cubre S<sub>461-493</sub>. Este antígeno mostró una reactividad positiva con los anticuerpos de los ratones inmunizados con CCMV1 sin adyuvantes (G2), aunque con una magnitud menor que la mostrada ante los anticuerpos generados por CCMV1 + adyuvante (G3). Como era de esperar, este ELISA no detectó los anticuerpos generados por los ratones control negativo (G1) o los inmunizados con CP CCMV WT (G4). La drástica pérdida de sensibilidad en este ELISA sugiere que la falta de estructura terciaria en el péptido, en comparación con la proteína S de longitud completa, afecta negativamente el reconocimiento de anticuerpos generados con una versión “estructurada” del mismo péptido. La capacidad de unión de los anticuerpos inducidos por las quimeras de CP de CCMV también se determinó utilizando la proteína S de la variante Delta. La capacidad de unión de los anticuerpos inducidos por CCMV1 a la proteína S de la variante Delta fue menor (dos veces) en comparación con la de la proteína S de Wuhan, lo que era de esperarse, ya que la variante Delta posee una mutación puntual en el epítipo diana presente en CCMV1 (T478K).

El ELISA anti-CP reveló que los animales presentaron seroconversión después del primer refuerzo, lo que indica la inducción de anticuerpos contra el acarreador. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la respuesta anti-S fue magnificada por el antígeno CCMV1 a medida que se administró como refuerzo, lo que sugiere que los anticuerpos anti-CP no bloquean la inducción robusta de anticuerpos anti-RBD.

#### **4. DISCUSIÓN**

En el presente estudio, se expresaron proteínas quiméricas basadas en la CP de CCMV como inmunógenos atractivos contra el SARS-CoV-2. Los virus de plantas pueden ser una plataforma atractiva para el diseño y producción de

biofarmacéuticos, ya que pueden producirse en plantas o en sistemas recombinantes (p. ej., *E. coli*) a bajos costos. Además, pueden modificarse fácilmente genética y/o químicamente para presentar epítopes de interés. Por lo tanto, deben explorarse como una plataforma para generar vacunas y moléculas inmunomoduladoras. Además, el diseño racional de vacunas basado en epítopes protectores es una estrategia prometedora para desarrollar vacunas de subunidades efectivas[23]. Las propiedades intrínsecas de los virus de plantas les confieren una alta inmunogenicidad, por lo que la fusión de epítopes blanco a sus proteínas de la cápside puede dar lugar a una vacuna efectiva. Esto es especialmente importante en el contexto de la baja inmunogenicidad que tienen la mayoría de las vacunas de subunidades cuando se presentan sin los adyuvantes o sistemas de entrega apropiados.

En este proyecto, modificamos genéticamente la CP de CCMV para entregar diferentes epítopes de SARS-CoV-2 de la proteína S, que fundamentalmente busca lograr la inmunoprotección contra COVID-19. Como primer esfuerzo, decidimos utilizar la CP en su forma dimérica en lugar de partículas similares a los virus (VLPs) que contienen 180 CP con simetría icosaédrica. La elección de usar la CP en su forma dimérica estuvo motivada principalmente por el hecho de que la proteína recombinante se dirigía a los cuerpos de inclusión. No obstante, estamos optimizando el sistema de expresión para purificar la CP soluble y así inmunizar ratones con VLPs en lugar de la CP dimérica. Además, el objetivo de purificar las VLPs quiméricas de CCMV/SARS-CoV-2 está justificado por los títulos modestos de anticuerpos observados en los grupos inmunizados que no contienen el adyuvante.

De las tres CP quiméricas, CCMV1 se considera la más prometedora, ya que indujo niveles más altos de IgG dirigidos a la proteína S nativa. CCMV1 contiene el epítopo S<sub>460-500</sub>, que contiene un epítopo Th y CTL, así como seis sitios de unión a ACE2. Por lo tanto, esta quimera se evaluará en un futuro en forma de VLP para determinar si es capaz de inducir tal respuesta humoral en ausencia de adyuvantes.

Un tema de preocupación es la eficacia de las vacunas actuales contra las VOC actuales (*p.ej.*, Delta y Ómicron) y cualquier variante futura. Por ejemplo, los estudios han revelado que la variante Delta evade los anticuerpos neutralizantes de sueros de pacientes convalecientes, así como sueros de individuos vacunados con dos vacunas diferentes, una basada en un vector de adenovirus (ChAdOx1) y la otra basada en ARNm (BNT162b2) [26]. Sin embargo, las vacunas BNT162b2 y mRNA-1273 mostraron una eficacia alta ( $\geq 90$  %) contra la hospitalización y la muerte relacionadas con Delta, en línea con estudios del Reino Unido, Estados Unidos e Israel [27]. Además, después del esquema de la vacuna Pfizer en dos administraciones, la tasa de protección contra la variante Delta fue del 79-87 %, mientras que la de la vacuna AstraZeneca fue del 60 %, siendo ambas inferiores a las de la variante Alpha [28]. Estos resultados son consistentes con nuestros hallazgos. Por un lado, el epítipo en CCMV1 tiene una sola mutación con respecto a la variante Delta (T478K), y esto fue suficiente para disminuir la capacidad de los anticuerpos inducidos por CCMV1 para reconocer la proteína S de dicha variante. Estos resultados muestran claramente que la unión anticuerpo-antígeno está muy influenciada por el sitio de unión y su contexto estructural circundante.

Nuestro estudio sugiere que el uso de la CP de CCMV en ingeniería genética para presentar tres epítopos diferentes de SARS-CoV-2 de la proteína S es una opción promisoriosa para crear una vacuna eficaz contra COVID-19. Estudios previos han demostrado que esta proteína, en condiciones de pH adecuadas, forma VLP y otras estructuras no canónicas [16]. La capacidad de los virus de plantas como el CCMV y el virus del mosaico del bromo (BMV) [29] para autoensamblarse en presencia y ausencia de ácido nucleico, así como en diferentes formas puede convertirse en una ventaja para producir proteínas quiméricas que presenten múltiples copias del antígeno de interés, lo que podría disminuir la necesidad de utilizar adyuvantes. Además, una consideración importante es que las nanotecnologías de virus de plantas ofrecen una alta estabilidad térmica [30]. Las VLPs de CCMV pueden ser estables a temperaturas entre  $-80$  y  $50$  °C, superando así la necesidad de almacenamiento y distribución en cadena de frío [31]. Esta es una clara ventaja sobre las plataformas de vacunas ya aprobadas hoy en día, como las vacunas de

ARNm. Otra ventaja de la plataforma basada en CCMV está relacionada con el efecto perjudicial sobre la eficacia de la vacuna inducida por anticuerpos bloqueadores. Tras la inmunización, se indujeron anticuerpos anti-CP. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la segunda y la tercera inmunización indujeron un aumento significativo en los niveles de anticuerpos que respaldan la efectividad del refuerzo con los antígenos basados en CP. Otro dato clave es que el CCMV no infecta plantas comestibles para el consumo humano, por lo que se espera que los individuos vacunados no tengan anticuerpos anti-CP en la fase de preparación, lo que maximiza la acción de la vacuna; lo anterior contrasta con el caso de las vacunas adenovirales, caso en el que existe la posibilidad de la presencia de anticuerpos anti-adenovirus producto de infecciones previas [32,33].

La evaluación del potencial de neutralización de los anticuerpos inducidos por las quimeras basadas en CCMV está en curso, utilizando un ensayo de neutralización basado en un pseudovirus. Los anticuerpos específicos de RBD tienen una mayor potencia para neutralizar la infección con cepas de virus divergentes [34]. Sin embargo, los estudios sobre variantes anteriores de SARS-CoV-2 han demostrado que las mutaciones dentro del dominio de unión al receptor (RBD) median el escape de los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna [34],[35].[36].

La quimera CCMV1 mostró una respuesta inmune humoral suficiente contra la variante Delta, aunque menor que la contra la proteína S de Wuhan. Sin embargo, queda por evaluar la respuesta contra la variante de Ómicron, ya que Ómicron tiene 15 mutaciones en la región RBD de la proteína espiga, de las cuales seis pertenecen a la secuencia CCMV1 (E484A, S477N, T478K, Q493R, G496S y Q498Y). Dadas las 15 mutaciones presentes en el RBD de Ómicron, se anticipó que esta variante estaría significativamente asociada con la evasión inmune [35, 37]. De hecho, hay evidencia que muestra que Ómicron podría conducir a una reducción de 10 a 40 veces en la capacidad de neutralización [38].

Estudios previos coinciden en que los costos de cultivo de *E. coli* son de 10 a 100 veces que los del cultivo de células eucariotas no microbianas [39]. Algunos grupos

han explorado la expresión de RBD en *E. coli*; sin embargo, esta proteína recombinante es en gran medida insoluble y, por lo tanto, requiere solubilización y repliegamiento [40], quizás debido a la incompatibilidad entre los cuatro enlaces disulfuro en la estructura RBD nativa y el entorno reductor del citoplasma de *E. coli* [41]. Nuestras quimeras basadas en la CP de CCMV se solubilizaron fácilmente y dieron como resultado proteínas estables, lo que representa una plataforma muy prometedora para producir vacunas basadas en epítopes contra el SARS-CoV-2. Los rendimientos de biomasa oscilaron entre 14 y 15,15 g/L, mientras que el rendimiento de proteína recombinante fue de 750 µg/L en promedio, que es inferior a otros estudios que informaron rendimientos de biomasa de 28 g/L y rendimientos de proteína recombinante de 122 mg/L [39].

Los ratones y los seres humanos tienen varios isotipos de IgG que difieren en su capacidad para inducir una respuesta inmune innata, activar el sistema del complemento y activar a fagocitos y células NK a través de los receptores Fcγ [40]. Cuando los ratones BALB/c generan una respuesta Th2, se produce predominantemente IgG1, mientras que las respuestas Th1 comprenden anticuerpos IgG2a predominantes [42]. La respuesta inmunitaria inducida por las quimeras de prueba comprendió predominantemente la subclase IgG1, lo que sugiere la inducción de una respuesta polarizada hacia Th2, lo que ofrece una perspectiva interesante para evaluar el potencial neutralizante de los anticuerpos inducidos.

En la mayoría de los estudios, la eficacia o efectividad de la vacuna contra las complicaciones graves de la enfermedad se mantuvo alta ( $\geq 70$  %) hasta 6 meses después de la vacunación para Pfizer–BioNTech, Moderna-mRNA, Janssen-Ad26.COVS y AstraZeneca-Vaxzevria (y en su mayoría  $\geq 80$  % para las dos vacunas de ARNm) [43]. El seguimiento de la inmunidad adquirida con las quimeras se realizó hasta 4 meses después de la última dosis administrada a los ratones, mostrando una respuesta favorable incluso a títulos séricos elevados para CCMV1 con adyuvante. Un punto por considerar es que la disminución de la protección

contra la infección con el tiempo se debió tanto a la disminución de la inmunidad como a la aparición de variantes [44], [45].

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2, *Nat. Microbiol.* 5 (4) (2020) 536–544, <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- [2] K. Rawat, P. Kumari, L. Saha, COVID-19 vaccine: a recent update in pipeline vaccines, their design and development strategies, *Eur. J. Pharmacol.* 892 (2021), 173751, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173751>.
- [3] D. Martínez-Flores, J. Zepeda-Cervantes, A. Cruz-Reséndiz, S. Aguirre-Sampieri, A. Sampieri, L. Vaca, SARS-CoV-2 vaccines based on the spike glycoprotein and implications of new viral variants, *Front. Immunol.* 12 (2021), 701501, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701501>.
- [4] J. Yang, W. Wang, Z. Chen, et al., A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity, *Nature* 586 (2020) 572–577, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>.
- [5] S. Alexandersen, A. Chamings, T.R. Bhatta, SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication, *Nat. Commun.* 11 (2020) 6059, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19883-7>.
- [6] R. Sanjuán, P. Domingo-Calap, Mechanisms of viral mutation, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (23) (2016) 4433–4448, <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.
- [7] J.Y. Choi, D.M. Smith, SARS-CoV-2 variants of concern, *Yonsei Med. J.* 62 (11) (2021) 961–968, <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>.
- [8] J. Chen, R. Wang, N.B. Gilby, G.W. Wei, Omicron (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance, *ArXiv*, 2021 arXiv:2112.01318v1.
- [9] Hui-Yao Huang, Yu. Shu-Hang Wang, Wei Sheng Tang, Chi-Jian Zuo, Wu. Da-Wei, Hong Fang, Du. Qiong, Ning Li, Landscape and progress of global COVID-19 vaccine development, *Hum. Vaccin. Immunother.* 17 (10) (2021) 3276–3280, <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1945901>.
- [10] L. Du, Y. He, S. Jiang, B.J. Zheng, Development of subunit vaccines against severe acute respiratory syndrome, *Drugs Today* 44 (2008) 63–73, <https://doi.org/10.1358/dot.2008.44.1.1131830>.
- [11] M. Verdecia, J.F. Kokai-Kun, M. Kibbey, S. Acharya, J. Venema, F. Atouf, COVID19 vaccine platforms: delivering on a promise. *Hum. Vaccin. Immunother.* 17 (9) (2021) 2873–2893, <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1911204>.
- [12] A. Singh, G. Kaur, S. Singh, N. Singh, G. Saxena, P.C. Verma, Recombinant plant engineering for immunotherapeutic production, *Curr. Mol. Biol. Rep.* 3 (4) (2017) 306–316, <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0078-2>.
- [13] P. Lam, N.F. Steinmetz, Delivery of siRNA therapeutics using cowpea chlorotic mottle virus-like particles, *Biomater. Sci.* 7 (8) (2019) 3138–3142, <https://doi.org/10.1039/c9bm00785g>.
- [14] S. Zinkhan, A. Ogrina, I. Balke, G. Reseviĉca, A. Zeltins, S. de Brot, C. Lipp, X. Chang, L. Zha, M. Vogel, M.F. Bachmann, M.O. Mohsen, The impact of size on particle drainage dynamics and antibody response, *J. Control. Release* 331 (2021) 296–308, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.012>.
- [15] S. Timmermans, D. Vervoort, L. Schoonen, R. Nolte, J. van Hest, Self-assembly and stabilization of hybrid cowpea chlorotic mottle virus particles under nearly physiological conditions, *Chem. Asian J.* 13 (22) (2018) 3518–3525, <https://doi.org/10.1002/asia.201800842>.

- [16] A. Hassani-Mehraban, S. Creutzburg, L. van Heereveld, R. Kormelink, Feasibility of cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations, *BMC Biotechnol.* 15 (2015) 80, <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0180-6>.
- [17] A. Díaz-Valle, Y.M. García-Salcedo, G. Chavez-Calvillo, L. Silva-Rosales, M. Carrillo-Tripp, Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and in vitro pH-dependent assembly of virus-like particles, *J. Virol. Methods* 225 (2015) 23–29, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.023>.
- [18] R.F. Garmann, M. Comas-Garcia, M.S. Koay, J.J. Cornelissen, C.M. Knobler, W. M. Gelbart, Role of electrostatics in the assembly pathway of a single-stranded RNA virus, *J. Virol.* 88 (18) (2014) 10472–10479, <https://doi.org/10.1128/JVI.01044-14>.
- [19] L. Lavelle, J.P. Michel, M. Gingery, The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids, *J. Virol. Methods* 146 (1–2) (2007) 311–316, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.020>.
- [20] S. Farfan-Castro, M.J. García-Soto, M. Comas-García, J.I. Arévalo-Villalobos, G. Palestino, O. Gonzalez-Ortega, S. Rosales-Mendoza, Synthesis and immunogenicity assessment of a gold nanoparticle conjugate for the delivery of a peptide from SARS-CoV-2, *Nanomedicine* 34 (2021), 102372, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102372>.
- [21] A. Grifoni, J. Sidney, Y. Zhang, R.H. Scheuermann, B. Peters, A. Sette, A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2, *Cell Host Microbe* 27 (4) (2020) 671–680, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002.e2>.
- [22] S. Kimar, V.K. Maurya, A.K. Prasad, M. Bhatt, S.K. Saxena, Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV), *Virusdisease* 31 (1) (2020) 13–21, <https://doi.org/10.1007/s13337-020-00571-5>.
- [23] M. Bhattacharya, A.R. Sharma, P. Patra, P. Ghosh, G. Sharma, B.C. Patra, S.S. Lee, C. Chakraborty, Development of epitope-based peptide vaccine against novel coronavirus 2019 (SARS-COV-2): immunoinformatics approach, *J. Med. Virol.* 92 (6) (2020) 618–631, <https://doi.org/10.1002/jmv.25736>.
- [24] L. Lavelle, M. Gingery, M. Phillips, W.M. Gelbart, C.M. Knobler, R.D. Cadena-Nava, J.R. Vega-Acosta, L.A. Pinedo-Torres, J. Ruiz-Garcia, Phase diagram of selfassembled viral capsid protein polymorphs, *J. Phys. Chem. B* 113 (12) (2009) 3813–3819, <https://doi.org/10.1021/jp8079765>.
- [25] J.A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T.S. Baker, J.E. Johnson, Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy, *Structure* 3 (1) (1995) 63–78.
- [26] P. Mlcochova, S.A. Kemp, M.S. Dhar, G. Papa, B. Meng, I. Ferreira, R. Datir, D. A. Collier, A. Albecka, S. Singh, R. Pandey, J. Brown, J. Zhou, N. Goonawardane, S. Mishra, C. Whittaker, T. Mellan, R. Marwal, M. Datta, S. Sengupta, R.K. Gupta, SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion, *Nature* 599 (7883) (2021) 114–119, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>.
- [27] P. Tang, M.R. Hasan, H. Chemaitelly, et al., BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 Delta variant in Qatar, *Nat. Med.* 27 (2021) 2136–2143, <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01583-4>.
- [28] L. Bian, Q. Gao, F. Gao, Q. Wang, Q. He, X. Wu, Q. Mao, M. Xu, Z. Liang, Impact of the Delta variant on vaccine efficacy and response strategies, *Expert Rev. Vaccines* 20 (10) (2021) 1201–1209, <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1976153>.

- [29] A. Nunez-Rivera, P. Fournier, D.L. Arellano, A.G. Rodriguez-Hernandez, R. Vazquez-Duhalt, R.D. Cadena-Nava, Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes, *Beilstein J. Nanotechnol.* 11 (2020) 372–382, <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>.
- [30] M. Hema, G.P. Vishnu Vardhan, H.S. Savithri, M.R.N. Murthy, in: Chapter 6 - Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications, 2019, pp. 61–82, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4>.
- [31] O.A. Ortega-Rivera, S. Shukla, M.D. Shin, A. Chen, V. Beiss, M.A. MorenoGonzalez, Y. Zheng, A.E. Clark, A.F. Carlin, J.K. Pokorski, N.F. Steinmetz, Cowpea mosaic virus nanoparticle vaccine candidates displaying peptide epitopes can neutralize the severe acute respiratory syndrome coronavirus, *ACS Infect. Dis.* 7 (11) (2021) 3096–3110, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00410>.
- [32] A.M. Leen, et al., Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy, *J. Virol.* 82 (2008) 546–554.
- [33] S.A. Mendonça, R. Lorincz, P. Boucher, D.T.N.P.J. Curiel, Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic, *Vaccines* 6 (1) (2021 Aug 5) 97, <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>.
- [34] S. Jiang, C. Hillyer, L. Du, Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses, *Trends Immunol.* 41 (5) (2020) 355–359, <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.007>.
- [35] W.F. Garcia-Beltran, K.J. St Denis, A. Hoelzemer, E.C. Lam, A.D. Nitido, M. L. Sheehan, C. Berrios, O. Ofoman, C.C. Chang, B.M. Hauser, J. Feldman, A. L. Roederer, D.J. Gregory, M.C. Poznansky, A.G. Schmidt, A.J. Iafrate, V. Naranbhai, A.B. Balazs, mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 omicron variant, *Cell* 185 (3) (2022) 457–466, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.033>.
- [36] Y. Zhang, K. Lin, Y. Zhang, J. Wu, Y. Wan, Y. Huang, J. Song, Z. Fu, H. Wang, J. Guo, N. Jiang, M. Fan, Y. Zhou, Y. Zhao, Q. Zhang, Q. Liu, J. Lv, P. Li, W. Zhang, Omicron variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARS-CoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost, *Emerg. Microbes Infect.* 11 (1) (2022) 337–343, <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2022440>.
- [37] E. Cameroni, J.E. Bowen, L.E. Rosen, et al., Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 omicron antigenic shift, *Nature* 602 (2022) 664–670, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04386-2>.
- [38] J. Ai, H. Zhang, Y. Zhang, K. Lin, Y. Zhang, J. Wu, Y. Wan, Y. Huang, J. Song, Z. Fu, H. Wang, J. Guo, N. Jiang, M. Fan, Y. Zhou, Y. Zhao, Q. Zhang, Q. Liu, J. Lv, P. Li, W. Zhang, Omicron variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARSCoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost, *Emerg. Microbes Infect.* 11 (1) (2022) 337–343, <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2022440>.
- [39] B.E. McGuire, J.E. Mela, V.C. Thompson, L.R. Cucksey, C.E. Stevens, R. L. McWhinnie, D. Winkler, S. Pelech, F.E. Nano, Escherichia coli recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments, *Microb. Cell Factories* 21 (1) (2022) 21, <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01753-0>.
- [40] F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, Fc-receptors as regulators of immunity, *Adv. Immunol.* 96 (2007) 179–204.
- [41] G.A. Fitzgerald, A. Komarov, A. Kaznadzey, I. Mazo, M.L. Kireeva, Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in E coli, and its refolding and purification, *Protein Expr. Purif.* 183 (2021), 105861.

- [42] M.L. Bellone, A. Puglisi, F. Dal Piaz, A. Hochkoepler, Production in Escherichia coli of recombinant COVID-19 spike protein fragments fused to CRM197, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 558 (2021) 79–85.
- [43] X. Liu, X. Chang, D. Rothen, M. Derveni, P. Krenger, S. Roongta, E. Wright, M. Vogel, K. Tars, M.O. Mohsen, M.F. Bachmann, AP205 VLPs based on dimerized capsid proteins accommodate RBM domain of SARS-CoV-2 and serve as an attractive vaccine candidate, *Vaccines* 9 (4) (2021) 403, <https://doi.org/10.3390/vaccines9040403>.
- [44] D.R. Feikin, M.M. Higdon, L.J. Abu-Raddad, N. Andrews, R. Araos, Y. Goldberg, M. J. Groome, A. Huppert, K.L. O'Brien, P.G. Smith, A. Wilder-Smith, S. Zeger, M. Deloria Knoll, M.K. Patel, Duration of effectiveness of vaccines against SARSCoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression, *Lancet (London, England)* 399 (10328) (2022) 924–944, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00152-0).
- [45] D.Y. Lin, Y. Gu, B. Wheeler, H. Young, S. Holloway, S.K. Sunny, Z. Moore, D. Zeng, Effectiveness of Covid-19 vaccines over a 9-month period in North Carolina, *N. Engl. J. Med.* (2022), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117128arXiv:2112.01318v1> .

**Reseña del artículo: Production and characterization of chimeric SARS-CoV-2 antigens based on the capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus**

El artículo correspondiente a este trabajo fue aceptado para su publicación en una revista científica indexada (**ANEXO**).

# **ANEXO**



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

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

## Production and characterization of chimeric SARS-CoV-2 antigens based on the capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus

Claudia Almendárez-Rodríguez<sup>a,b</sup>, Karla I. Solís-Andrade<sup>b</sup>, Dania O. Govea-Alonso<sup>b</sup>,  
Mauricio Comas-García<sup>b,c,d,\*</sup>, Sergio Rosales-Mendoza<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP 78210, Mexico

<sup>b</sup> Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2<sup>o</sup>. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

<sup>c</sup> Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2<sup>o</sup>. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, 78210 San Luis, S.L.P., San Luis Potosí 78210, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Humoral response  
Plant virus  
Chimeric protein

## ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has highlighted the need for new vaccine platforms to rapidly develop solutions against emerging pathogens. In particular, some plant viruses offer several advantages for developing subunit vaccines, such as high expression rates in *E. coli*, high immunogenicity and safety, and absence of pre-immunity that could interfere with the vaccine's efficacy. Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) is a model system that has been extensively characterized, with key advantages for its use as an epitope carrier. In the present study, three relevant epitopes from the SARS-CoV-2 Spike protein were genetically inserted into the CCMV CP and expressed in *E. coli* cultures, resulting in the CCMV1, CCMV2, and CCMV3 chimeras. The recombinant CP mutants were purified from the formed inclusion bodies and refolded, and their immunogenicity as a subunit vaccine was assessed in BALB/c mice. The three mutants are immunogenic as they induce high IgG antibody titers that recognize the recombinant full-length S protein. This study supports the application of CCMV CP as an attractive carrier for the clinical evaluation of vaccine candidates against SARS-CoV-2. Furthermore, it suggests that VLPs assembled from these chimeric proteins could result in antigens with better immunogenicity.

## 1. Introduction

The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2) is the etiological agent of the Coronavirus 19 Disease (COVID-19), originated in the province of Wuhan, China, in 2019 [1]; which rapidly imposed a considerable burden on public health, disrupted the global economy, and almost all social activities [2]. Nonetheless, this pandemic helped to develop novel vaccine platforms and technologies that seemed far from being approved for human health purposes [3]. In particular, the development of vaccines is the most crucial approach to combat this pandemic resulting in an unprecedented, accelerated development of several candidates.

Neutralizing antibodies and/or T-cell immune responses are the basis for providing immunoprotection against SARS-CoV-2, with the Spike (S) protein being the primary target immunogen. Based on studies

with SARS-CoV and MERS-CoV, it was rapidly identified that the "Receptor Binding Domain" (RBD) in the S1 domain of the S protein is the primary site for the induction of neutralizing antibodies [4].

Coronaviruses have the most stable genome amongst single-stranded RNA (ssRNA) viruses [5]. Their mutation rate is higher than double-stranded DNA viruses [6] but lower than most ssRNA viruses. Highly pathogenic coronaviruses can mutate to generate a series of SARS-CoV-2 variants of concern (VOC). VOCs are defined as those that have genetic changes that are predicted, or known, to affect viral characteristics such as transmissibility, disease severity, and immune escape [7]. Amongst all VOC, the WHO has cataloged the Delta variant (lineage B.1.617.2 y AY) and omicron variant (lineage B.1.1.529 y BA) as the most concerning ones; there are key point mutations that help the virus to escape the neutralizing antibodies from recovered patients [8] and the approved vaccines.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2<sup>o</sup>. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico.

E-mail addresses: [mauricio.comas@uaslp.mx](mailto:mauricio.comas@uaslp.mx) (M. Comas-García), [rosales.s@uaslp.mx](mailto:rosales.s@uaslp.mx) (S. Rosales-Mendoza).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.021>

Received 6 April 2022; Received in revised form 2 June 2022; Accepted 5 June 2022

Available online 8 June 2022

0141-8130/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.