



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

**DOCTORADO INSTITUCIONAL EN INGENIERÍA  
Y CIENCIA DE MATERIALES**

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CONJUGADOS ANTIGÉNICOS  
BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA INMUNIZACIÓN  
CONTRA SARS-CoV-2**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN INGENIERÍA Y CIENCIA DE MATERIALES**

**PRESENTA**

**M.C. SUSAN ITZEL FARFÁN CASTRO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. SERGIO ROSALES MENDOZA**

**CODIRECTOR DE TESIS**

**Dr. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA**



---

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO DE 2025



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

**DOCTORADO INSTITUCIONAL EN INGENIERÍA  
Y CIENCIA DE MATERIALES**

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CONJUGADOS ANTIGÉNICOS  
BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA INMUNIZACIÓN  
CONTRA SARS-CoV-2**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN INGENIERÍA Y CIENCIA DE MATERIALES**

PRESENTA

**M. C. SUSAN ITZEL FARFÁN CASTRO**

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. SERGIO ROSALES MENDOZA

**Comité tutorial:**

Dr. Sergio Rosales Mendoza

\_\_\_\_\_

Dr. Omar González Ortega

\_\_\_\_\_

Dr. César Fernando Azael Gómez Durán

\_\_\_\_\_

Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo

\_\_\_\_\_

Dra. Leticia Moreno Fierros

\_\_\_\_\_

Dr. Mariano de Jesús García Soto

\_\_\_\_\_



---

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO DE 2025

El programa de Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000140, en el Nivel Doctorado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 971994

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE CONJUGADOS ANTIGÉNICOS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA INMUNIZACIÓN CONTRA SARS-CoV-2 © 2025 por Susan Itzel Farfán Castro tiene licencia CC BY-NC-ND 4.0**



## DEDICATORIA

A Dios, por ser mi fortaleza constante a lo largo de este camino. Durante el doctorado enfrenté distintos retos y momentos complicados que pusieron a prueba mi constancia. Sin embargo, nunca estuve sola. Sentí un respaldo firme y constante que me sostuvo cuando mis fuerzas no bastaban, que abrió caminos donde no los veía, y que me permitió llegar hasta aquí con más de lo que jamás imaginé.

Hoy, al mirar atrás, reconozco que este logro no es solo académico, sino también espiritual. Es testimonio de que hay planes y propósitos más altos que los nuestros, y que, cuando se camina con fe, lo imposible se vuelve posible.

*“Las cosas que ojo no vio, ni oído oyó, ni han subido en corazón de hombre, son las que Dios ha preparado para los que le aman.”*

— 1 Corintios 2:9 RVR1960

## **AGRADECIMIENTOS**

Ante todo, agradezco a Dios por su presencia constante, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y mi guía en cada paso de este camino.

A mis abuelos, Esteban Farfán Jaramillo y Ma. del Refugio Montes Salinas, les agradezco por enseñarme, con su ejemplo de vida, el valor de la perseverancia y la resiliencia. Su historia y su amor han sido una inspiración constante para nunca rendirme.

A mis padres, Saúl y Susana, no existen palabras suficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí. Gracias por su amor incondicional, por sus sacrificios silenciosos, por su apoyo incansable y por creer en mí con todo el corazón. Ustedes son el motor de mis sueños, mi ejemplo y mi mayor bendición.

A mis hermanos, gracias por su compañerismo, por las risas, los consejos, los momentos compartidos y el apoyo que siempre me han brindado. Son parte esencial de mi vida y de este logro.

A mi familia Ágape Tangamanga, gracias por ser un sostén espiritual y emocional invaluable. Su amor fraternal, sus oraciones y su presencia en mi vida me han dado fortaleza y ánimo en los momentos más cruciales.

Agradezco profundamente al Dr. Roberto Quezada Calvillo, por haber sido quien sembró en mí la semilla de la curiosidad científica y por motivarme desde mis inicios a dedicarme a la investigación.

A mis co-directores, el Dr. Sergio Rosales Mendoza y el Dr. Omar González Ortega, por su apoyo, compromiso y paciencia a lo largo de este proyecto. Sus enseñanzas han enriquecido profundamente mi formación académica y personal.

Al Dr. Mariano García Soto, al Dr. Mauricio Comas García y a la Dra. Lourdes Betancourt Mendiola, por su apoyo constante, su generosidad al compartir su conocimiento y su valioso compañerismo, que hicieron de este proceso una experiencia de aprendizaje integral y humana.

Gracias también a todas las personas que, de una u otra manera, formaron parte de este trayecto.

## RESUMEN

La pandemia por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) dejó patente la necesidad de plataformas vacunales innovadoras que ofrezcan seguridad, eficacia y adaptabilidad frente a variantes emergentes. De entre las tecnologías aplicables al desarrollo de vacunas innovadoras, las nanopartículas de oro (AuNP) han emergido como una opción promisoría para el desarrollo de vacunas de subunidad, debido a su biocompatibilidad, estabilidad fisicoquímica y capacidad para modular la respuesta inmunitaria. Esta tesis doctoral tuvo como objetivo el diseño, caracterización y evaluación preclínica de conjugados antigénicos basados en AuNP funcionalizadas con péptidos derivados de la proteína espícula (Spike, proteína S) del SARS-CoV-2, con el fin de explorar su potencial como nanovacunas.

La metodología incluyó la síntesis controlada de AuNP, su funcionalización con polietilenglicol heterobifuncional (PEG) y posterior conjugación con péptidos inmunogénicos. La caracterización estructural y fisicoquímica de los conjugados se llevó a cabo mediante espectroscopía UV-Vis, dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se evaluó la citotoxicidad en líneas celulares y la captación por células dendríticas (DCs), así como la expresión de marcadores de maduración y el perfil de citocinas. Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados antigénicos basados en AuNP en términos de la inducción de respuestas humorales y se analizaron los efectos histopatológicos de la inmunización.

Los resultados revelaron una alta eficiencia en la conjugación de péptidos, estabilidad coloidal y ausencia de citotoxicidad significativa. Las AuNP fueron eficientemente internalizadas por DCs, induciendo maduración y modulación del perfil inflamatorio, destacando una reducción en la secreción de TNF- $\alpha$ . La evaluación de la respuesta humoral específica evidenció títulos elevados de IgG y de subclases funcionales, sin

observarse daño tisular sistémico, salvo una inflamación hepática localizada compatible con efectos inmunomoduladores.

En conjunto, los hallazgos de este trabajo experimental sustentan el potencial de las AuNP como plataforma vacunal segura y eficaz, y establecen una base sólida para su optimización y futura evaluación en biomodelos de desafío infeccioso.

## Índice General

|  |      |
|--|------|
| RESUMEN .....  | vi   |
| Índice General .....   | viii |
| Índice de Figuras .....  | xii  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 15   |
| ANTECEDENTES .....   | 20   |
| 1. Introducción a la COVID-19 y SARS-CoV-2 .....   | 20   |
| 2. Desarrollo de Vacunas Contra COVID-19 .....   | 22   |
| 3. Desafíos en la Vacunación .....   | 23   |
| 4. AuNP: Propiedades y Aplicaciones .....  | 24   |
| Propiedades Físicoquímicas de las AuNP: .....  | 25   |
| Biocompatibilidad y Funcionalización Superficial .....   | 26   |
| Aplicaciones de las AuNP .....   | 27   |
| Mecanismos de Acción de las AuNP en el Sistema Inmunológico.....                               | 29   |
| 5 AuNP en el Desarrollo de Vacunas .....   | 32   |
| Propiedades de las AuNP Como Vehículos de Antígenos .....                                      | 32   |
| Uso de AuNP como Adyuvantes .....  | 33   |
| Ejemplos de Eficacia de las AuNP en Vacunas .....  | 35   |
| Ventajas de las AUNP sobre otros nanomateriales .....  | 36   |
| 6. Diseño de Vacunas Basadas en Péptidos .....   | 37   |
| 7. Métodos de Conjugación de Péptidos a AuNP y su Caracterización.....                         | 38   |
| 8. Estudios Preclínicos Sobre el Uso de AuNP Como Plataformas Vacunales Contra SARS-CoV-2..... | 40   |
| 9. Seguridad y Evaluación de Toxicidad de AuNP.....  | 42   |

|  |    |
|--|----|
| 10. Avances Recientes en la Nanotecnología de AuNP .....           | 44 |
| JUSTIFICACIÓN .....  | 46 |
| HIPÓTESIS .....  | 47 |
| Hipótesis específicas: .....                                       | 47 |
| OBJETIVOS .....  | 48 |
| Objetivo General .....   | 48 |
| Objetivos Específicos .....  | 48 |
| METODOLOGÍA.....   | 49 |
| Selección de antígenos .....                                       | 49 |
| Síntesis de AuNP .....   | 49 |
| Cálculo de la Concentración de Oro Coloidal.....                   | 50 |
| Funcionalización de Superficie .....                               | 52 |
| Estrategia de Bioconjugación .....                                 | 54 |
| Cálculo de Péptido Requerido.....                                  | 54 |
| Cuantificación Indirecta de Péptido Unido mediante HPLC .....      | 55 |
| Caracterización de AuNP.....                                       | 55 |
| Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) .....                 | 55 |
| Dispersión de Luz Dinámica (DLS) .....                             | 56 |
| Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....                  | 56 |
| Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) ..... | 56 |
| Análisis Termogravimétrico .....                                   | 57 |
| Estudios <i>in vitro</i> .....                                     | 57 |
| Evaluación de Citotoxicidad .....                                  | 57 |
| Ensayo de internalización celular .....                            | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Determinación de marcadores de maduración en DCs mediante citometría de flujo ..... | 59 |
| Perfil de citocinas en DCs .....  | 60 |
| Estudios <i>in vivo</i> en ratones BALB/c .....                                     | 60 |
| Ensayo de inmunización .....  | 60 |
| Ensayo ELISA .....  | 61 |
| Procesamiento de tejidos para análisis histológico y TEM.....                       | 61 |
| Análisis estadístico .....  | 62 |
| RESULTADOS .....  | 63 |
| Propiedades fisicoquímicas y morfológicas de los conjugados de oro .....            | 63 |
| Caracterización FTIR.....   | 65 |
| Análisis Termogravimétrico.....   | 67 |
| Determinación de péptido unido .....  | 69 |
| Evaluación de citotoxicidad.....  | 72 |
| Evaluación de la respuesta humoral inducida por los conjugados de oro .....         | 73 |
| Efectos inmunomoduladores de AuNP en DCs: maduración y producción de citocinas..... | 75 |
| Efectos histopatológicos de las AuNP en ratones BALB/c .....                        | 77 |
| Captación celular de las AuNP .....   | 77 |
| DISCUSIÓN .....   | 82 |
| CONCLUSIONES.....   | 90 |
| ANEXO DE TABLAS .....   | 93 |
| ARTÍCULO PUBLICADO.....   | 97 |
| BIBLIOGRAFÍA .....  | 98 |

## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Características fisicoquímicas de los péptidos seleccionados. ....   | 49 |
| <b>Tabla 2.</b> Caracterización por DLS de AuNP estabilizadas con citrato, funcionalizadas con PEG y conjugadas con los péptidos. .... | 64 |
| <b>Tabla 3.</b> Densidad de injerto ( $\sigma_{TGA}$ ) de PEG en la superficie de las AuNP. ....                                       | 69 |
| <b>Tabla 4.</b> Comparación del contenido de péptidos en los conjugados de oro, basada en HPLC y TGA.....                              | 71 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Esquema representativo de la funcionalización de nanopartículas de oro (AuNP) con SH-PEG5K-NH <sub>2</sub> , seguida de la bioconjugación de péptidos por aminación reductiva. La superficie de las AuNP se recubre con PEG terminal amina, proporcionando sitios reactivos para el entrecruzamiento con glutaraldehído (GTA). Posteriormente, el péptido modelo P5 se une a través de sus grupos amina libres, y los enlaces imina formados se estabilizan mediante la reducción con borohidruro de sodio (NaBH <sub>4</sub> ). Este procedimiento permite una conjugación estable y orientada, preservando la funcionalidad del péptido. .... | 52 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de inmunización en ratones BALB/c.....   | 61 |
| <b>Figura 3.</b> Micrografía TEM de AuNP a 200 kV (A). Histograma de distribución de tamaño de nanopartículas (n=700 AuNP). ....  | 63 |
| <b>Figura 4.</b> Espectro UV-Vis normalizado de AuNP estabilizadas en citrato y su comparación con AuNP funcionalizadas con PEG o conjugadas con los péptidos seleccionados.....  | 64 |
| <b>Figura 5.</b> Espectros FTIR de citrato de sodio (A) y HS-PEG5K-NH <sub>2</sub> (B) en su forma pura. ....   | 65 |
| <b>Figura 6.</b> Espectros FTIR de nanopartículas de oro (AuNP) estabilizadas con citrato (Au <sup>0</sup> ), tras su funcionalización con PEG y posterior conjugación con péptidos (P1 a P5). Las bandas observadas en los espectros corresponden a distintos grupos funcionales, los cuales están detallados en la Tabla A 1 del Anexo. ....  | 66 |
| <b>Figura 7.</b> Resultados del análisis termogravimétrico (TGA) y de derivada (DTG) de citrato de sodio (A) y HS-PEG5K-NH <sub>2</sub> (B) en su forma pura, con el objetivo de identificar las señales térmicas correspondientes a los estabilizadores utilizados en la síntesis y funcionalización de AuNP. ....   | 67 |
| <b>Figura 8.</b> Resultados del análisis termogravimétrico (A) y de derivada (B) de AuNP estabilizadas con citrato, funcionalizadas con PEG y conjugadas con los péptidos P1  |    |

|  |    |
|--|----|
| a P5. La banda gris indica el rango de temperatura donde se observó la pérdida de peso atribuida a la descomposición de los péptidos. ....   | 68 |
| <b>Figura 9.</b> Curvas de calibración de los péptidos P1 a P5 en un rango de concentración de 25 a 200 µg/mL, cuantificado por HPLC.....  | 70 |
| <b>Figura 10.</b> Cuantificación por HPLC de péptidos P1–P5 en sobrenadantes tras su conjugación con AuNP. La fracción unida (µg péptido / mg AuNP) se estimó desde la absorbancia a 214 nm y se comparó con la concentración inicial ( $C_0$ ). ....  | 71 |
| <b>Figura 11.</b> Evaluación de viabilidad celular en la línea HEK293-T tras exposición a AuNP-PEG y AuNP-mpS. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; ns = no significativo).....   | 72 |
| <b>Figura 12.</b> Evaluación de inmunogenicidad de péptidos administrados con hidróxido de aluminio o conjugados a AuNP. Niveles séricos de anticuerpos IgM (A) e IgG (B) inducidos en ratones BALB/c inmunizados con conjugados AuNP-P1 a P5 o mezcla peptídica con adyuvante (AH mpS). Anticuerpos detectados por ELISA (dilución 1:200) en distintos tiempos..... | 73 |
| <b>Figura 13.</b> Títulos de IgG anti-péptido (A), niveles séricos de IgG1 e IgG2a (B) y títulos de IgG anti-Spike (C) tras inmunización con conjugados individuales o dosis baja/alta de adyuvante HA. Anticuerpos evaluados por ELISA en el día 45. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; ns= no significativo).....         | 74 |
| <b>Figura 14.</b> Evaluación de la maduración in vitro de células dendríticas. Expresión de MHC-II (A), CD86 (B) y CD40 (C) en células DC2.4 tras 24 h de exposición a 50 µg/mL de AuNP-PEG. Resultados expresados como intensidad media de fluorescencia (MFI). ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (**p < 0.01; ns= no significativo). ....                      | 75 |
| <b>Figura 15.</b> Efecto de los tratamientos con AuNP en la concentración de citocinas en sobrenadantes de células DC2.4 tras 24 h de tratamiento con 10 µg Au/mL de AuNP-mpS, AuNP-PEG o vehículo. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (***p < 0.001; ns = no significativo).....   | 76 |

**Figura 16.** Análisis histológico de tejidos de piel, hígado y riñón de ratones BALB/c tratados con nanopartículas de oro (AuNP), utilizando tinción con H&E. Los ratones recibieron cuatro dosis de AuNP-mpS y fueron sacrificados dos meses después para su evaluación. (A) Sección de piel de un ratón tratado sin alteraciones histopatológicas significativas. (B) Pigmentación oscura en el sitio de inyección, con presencia del conjugado de oro; el inserto muestra la cara interna de la piel. (C, D) Micrografías TEM que revelaron acumulación lisosomal (estrellas amarillas) de AuNP en queratinocitos basales, adyacentes a fibras de colágeno (CF) en la epidermis. (E) Sección hepática de un ratón control. (F) Sección hepática de un ratón tratado con AuNPs, mostrando infiltrados inflamatorios cerca de la vena centrolobulillar. (G) Sección renal con estructuras glomerulares y tubulares normales..... 78

**Figura 17.** Micrografías de células DC2.4 tratadas con nanopartículas de oro (AuNP). Las células se cultivaron durante 6 h con vehículo como control (A) o con AuNP-PEG (B). También se cultivaron por 3 h (C, E, G) o 6 h (D, F, H) con los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3 o AuNP-P5, usando 10 µg/mL de AuNP en cada tratamiento. Se identificaron estructuras clave como mitocondrias (M), AuNP en endosomas tempranos (estrella verde) o tardíos (estrella morada), membranas de aislamiento (doble flecha), autofagosomas (punta de flecha negra), AuNP libres en el citoplasma (flecha roja) y cuerpos multivesiculares (flecha azul)..... 79

**Figura 18.** Micrografías electrónicas de células DC2.4 expuestas al conjugado AuNP-P3 durante 6 h. (A) Las AuNP se localizan dentro de compartimentos endosómicos (asterisco) y dispersas en el citoplasma (flechas rojas). (B-D) Etapas de internalización de AuNP en fosas recubiertas de clatrina, con distintos grados de invaginación. Las puntas de flecha blancas indican la extensión de las fosas, y en (D), las flechas señalan los cuellos que las conectan con el exterior celular..... 80

**Figura 19.** Inducción de zonas ricas en exosomas en células DC2.4 tras 3 h (A) y 6 h (B) de tratamiento con AuNP-P5 (10 µg/mL). Las zonas con exosomas están marcadas con líneas punteadas, las fosas con clatrina con puntas de flecha blancas y las AuNP libres en el citoplasma con flechas rojas. .... 81

## INTRODUCCIÓN

La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) afectó a más de 777 millones de personas en todo el mundo y causó la muerte de poco más de 7 millones hasta mayo de 2025, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023). Este impacto devastador evidenció la vulnerabilidad de los sistemas de salud a nivel global y destacó la necesidad urgente de una respuesta eficaz y coordinada ante los virus emergentes derivados de eventos zoonóticos. El agente causal de la COVID-19, SARS-CoV-2, pertenece a la familia *Betacoronaviridae*, que también incluye otros coronavirus patógenos como el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 1 (SARS-CoV-1) y el coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). Estos virus han causado brotes epidémicos significativos en el pasado, específicamente en 2003 y 2012, respectivamente (Krishnamoorthy et al., 2020). La historia reciente de estos brotes evidencia la importancia de la vigilancia epidemiológica y la preparación para pandemias, así como la necesidad de desarrollar rápidamente herramientas efectivas para combatir nuevos patógenos.

La rápida propagación del SARS-CoV-2 llevó a un impacto epidemiológico sin precedentes, que condujo a un desarrollo acelerado de vacunas. En un tiempo récord se aprobaron diversas vacunas para uso de emergencia, basadas en diferentes plataformas, que incluyen vacunas de ARNm (Moderna y Pfizer-BioNTech), vectores virales no replicantes (Oxford-AstraZeneca), virus inactivados (Sinovac y Bharat Biotech) y proteínas recombinantes (Novavax y Sanofi-GSK) como inmunógenos (Callaway, 2020; Chung et al., 2021). Este esfuerzo global ha sido un testimonio de la capacidad de la ciencia y la tecnología para responder a una crisis de salud pública, pero también ha revelado desafíos significativos relacionados con la equidad en la distribución de vacunas, la eficacia frente a variantes emergentes, la adopción de un conjunto amplio de nuevas tecnologías y la aceptación pública de las vacunas.

Actualmente, aunque no se han identificado variantes de preocupación (VOC) activas, la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2 continúa siendo objeto de vigilancia

estrecha. En particular, las variantes de interés (VOI) y las variantes bajo monitoreo (VUM) presentan mutaciones con posibles implicaciones fenotípicas que podrían afectar la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad o la eficacia de la respuesta inmunitaria (OMS, 2023b). Algunas de estas variantes han mostrado un potencial aumento en la capacidad de transmisión o una menor sensibilidad a los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación o infecciones previas (OMS, 2023c). Esto destaca la necesidad de mantener actualizadas las estrategias de vigilancia genómica, así como de desarrollar formulaciones vacunales adaptadas a las características genéticas emergentes del virus (OMS, 2024). Este contexto resalta la necesidad de un enfoque proactivo y flexible en el desarrollo de vacunas, que incluya la investigación de nuevas plataformas y estrategias.

El desarrollo de nuevas vacunas que utilicen antígenos diseñados racionalmente y métodos de administración por rutas de mucosas (por ejemplo, vías oral o intranasal) se presenta como una estrategia prometedora para superar las limitaciones de las vacunas existentes en cuanto a su facilidad de administración, así como a su efectividad contra la infección, la transmisión y la evasión por nuevas variantes (Dai & Gao, 2021; European Medicines Agency., 2021; U.S. Food and Drug Administration., 2021). Esta búsqueda de nuevas soluciones se apoya en la creciente comprensión de la biología del virus y la respuesta inmune del huésped, así como en los avances en tecnología de vacunas.

El objetivo típico en las vacunas COVID-19 actuales es la proteína S, que se ha identificado como un potente inmunógeno, incluso en su forma soluble, capaz de inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales protectoras (Kang et al., 2021). La proteína S es fundamental para la entrada del virus en las células huésped y, por lo tanto, es un objetivo estratégico para las vacunas. Sin embargo, la dependencia de la proteína S ha llevado a la necesidad de explorar alternativas, como el uso de péptidos sintéticos que representan epítomos de la proteína S. Esta estrategia permite enfocar la respuesta inmune en los determinantes antigénicos que median la

protección, aunque los péptidos por sí solos son generalmente poco inmunogénicos. Por ello, la inclusión de un vehículo de entrega particulado que funcione como adyuvante es crucial para mejorar la inmunogenicidad de estas formulaciones.

Las nanopartículas, en particular las nanopartículas de oro (AuNP), se han convertido en un material prometedor para su uso en nanovacunas debido a su biocompatibilidad (Shukla et al., 2005), su capacidad de modificación superficial con biomoléculas (Bartczak & Kanaras, 2011; Perry et al., 2012; Rahme et al., 2013; Vasquez et al., 2014; W. Wang et al., 2013), su tamaño conveniente y a sus métodos de síntesis (Favi et al., 2015; Mironava et al., 2010; Niikura et al., 2013). Estas características ofrecen un potencial significativo para el desarrollo de vacunas seguras y altamente inmunogénicas. La viabilidad de los prototipos de vacunas basadas en AuNP ha sido evaluada con resultados prometedores en términos de inducción de respuestas humorales y de células T (L. A. Dykman et al., 2018; Li et al., 2020a; Liu et al., 2021; C. Wang et al., 2017; Q. Zhou et al., 2016). Algunos estudios han reportado la inducción de respuestas Th1 (Climent et al., 2018; Shinchu et al., 2019), Th2 y Th17 (Tapia et al., 2021; Trabbic et al., 2021), lo que indica que estos vehículos son entidades versátiles para el diseño de un grupo diverso de vacunas. Además, las AuNP han mostrado ser internalizadas de manera eficiente por células dendríticas (DCs), lo que resulta en su activación y explica sus efectos adyuvantes (Raghuwanshi et al., 2012; Tomic et al., 2014).

Hasta ahora, la mayoría de las vacunas COVID-19 basadas en subunidades se han dirigido hacia la proteína S completa o su dominio de unión al receptor (RBD) como antígenos objetivo. Sin embargo, explorar vacunas basadas en epítomos formuladas con péptidos específicos se presenta como una alternativa viable para la generación de vacunas universales que no dependan exclusivamente del RBD, sino de epítomos lineales y conservados con potencial neutralizante (Poh et al., 2020).

La pandemia por COVID-19 desencadenó el desarrollo de vacunas innovadoras y de nueva generación como una vía alternativa para la inducción de respuestas inmunitarias óptimas. Los posibles puntos críticos al respecto son la inducción de respuestas humorales neutralizantes robustas que eviten la inducción de anticuerpos facilitadores de la infección. Un enfoque para lograr tales objetivos se basa en el uso de vacunas basadas en epítomos formuladas con péptidos, que permiten enfocar la respuesta en los epítomos particulares que inducen anticuerpos neutralizantes y evitando aquellos inductores de anticuerpos facilitadores. Por lo tanto, las vacunas basadas en epítomos son posiblemente el mejor enfoque para lograr la inducción de respuestas inmunitarias óptimas. Sin embargo, el uso de tales formulaciones antigénicas simplificadas en comparación con las vacunas basadas en virus completos impone el desafío de lograr una inmunogenicidad robusta, que a menudo se remedia mediante la inclusión de adyuvantes y/o vehículos para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna mediante varios mecanismos.

Entre los nanovehículos utilizados para este propósito, las AuNP son agentes prometedores, ya que tienen una toxicidad reducida y son aptas para la funcionalización con antígenos. A la fecha ya se han descrito algunos de los mecanismos moleculares que respaldan la aplicación de AuNP como vehículos de antígenos. Por ejemplo, se sabe que las AuNP son capturadas de manera eficiente por DCs, y este proceso se mejora si están cubiertas con polietilenglicol (PEG). La internalización celular ocurre por fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores en DCs y depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de las AuNP, determinadas por el tamaño y la modificación superficial de las éstas.

Se sabe que los conjugados de AuNP-antígeno aumentan el proceso de presentación de antígenos al promover la maduración efectiva de DCs y la proliferación de células T (linfocitos T) y NK (natural killer), logrando una mayor secreción de citocinas como IL-4 (asociada a respuestas humorales), IFN- $\gamma$  e IL-12 (proinflamatorias, relacionadas con la activación de Th1 y citotoxicidad) e IL-10 (antiinflamatoria, con función

reguladora). Una revisión reciente sobre el uso de nanomateriales el desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2, destaca el potencial de algunas vacunas previamente reportadas contra otros virus basadas en partículas metálicas, incluidas las AuNP. De hecho, se han reportado esfuerzos previos en el desarrollo de vacunas basadas en AuNP contra coronavirus, pero se requiere optimización en la formulación dada la limitada capacidad de neutralización limitada en algunos casos, posiblemente relacionada con el uso de la proteína S completa, la cual podría inducir una respuesta humoral no suficientemente neutralizante. Hasta ahora, se han reportado las evaluaciones preclínicas de varias vacunas basadas en AuNP con hallazgos prometedores. Por lo tanto, las vacunas basadas en AuNP representan un camino prometedor para el desarrollo de vacunas de subunidades diseñadas racionalmente. En este contexto, en la presente tesis doctoral se desarrollaron candidatos vacunales basados en AuNP a las que se ha conjugado un péptido derivado de la secuencia de la proteína S del SARS-CoV-2 como prototipos de nanovacuna; incluyendo su caracterización en términos de propiedades fisicoquímicas y de su inmunogenicidad en un biomodelo murino.

## **ANTECEDENTES**

### 1. Introducción a la COVID-19 y SARS-CoV-2

La pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha tenido un impacto global sin precedentes desde su aparición a finales de 2019. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta octubre de 2023, se reportaron casi 676.6 millones de infecciones y aproximadamente 6.9 millones de muertes a nivel mundial (World Health Organization, 2020). La COVID-19 ha desafiado los sistemas de salud pública, la economía y la vida cotidiana de millones de personas, provocando no solo una crisis sanitaria, sino también una crisis económica y social. Las medidas de contención, como el distanciamiento social, el uso de mascarillas y las restricciones de viaje se implementaron en todo el mundo para mitigar la propagación del virus (Guan et al., 2020).

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los coronavirus, específicamente al género Betacoronavirus, que también incluye otros virus patógenos conocidos como el SARS-CoV-1 (que causó un brote epidémico en 2003) y el MERS-CoV (responsable de brotes en 2012). Estos dos virus comparten similitudes genéticas con SARS-CoV-2, lo que sugiere un origen zoonótico común (P. Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020). Estos virus son conocidos por su capacidad para causar enfermedades respiratorias graves y su estudio ha proporcionado información valiosa sobre la patogénesis y la transmisión de los coronavirus (Peiris et al., 2004).

El SARS-CoV-2 se clasifica como un virus de ARN de cadena simple, con un genoma que codifica varias proteínas estructurales y no estructurales. La proteína S del virus es fundamental para su capacidad de infectar las células huésped, ya que permite la entrada del virus en éstas al unirse a los receptores ACE2 presentes en ellas (Hoffmann et al., 2020). La evolución y adaptación del SARS-CoV-2 han dado lugar a la aparición de diversas variantes, algunas de las cuales han mostrado un aumento en

la transmisibilidad y la capacidad de evadir la respuesta inmune, lo que planteó desafíos adicionales para el control de la pandemia (Korber et al., 2020).

Desde el inicio de la pandemia, se desarrollaron múltiples vacunas para combatir a la COVID-19. Hasta octubre de 2023, más de 13,000 millones de dosis de vacunas se habían administrado a nivel global, incluyendo formulaciones basadas en ARNm (como las de Pfizer-BioNTech y Moderna), vectores virales (como la de AstraZeneca) y proteínas recombinantes (como la de Novavax) (Callaway, 2020; Chung et al., 2021). Estas vacunas han demostrado ser efectivas en la reducción de la severidad de la enfermedad, hospitalizaciones y muertes, aunque la eficacia puede variar frente a nuevas variantes del virus (Dai & Gao, 2021).

Comparando SARS-CoV-2 con otros coronavirus patógenos, como el SARS-CoV-1 y el MERS-CoV, se observan diferencias significativas en su tasa de mortalidad y en su capacidad de propagación. Mientras que el SARS-CoV-1 tuvo una tasa de mortalidad de 9.6 % y fue contenido relativamente rápido, el MERS-CoV tiene una tasa de mortalidad aún más alta, del 34 %, pero su transmisión entre humanos es menos eficiente. El número básico de reproducción ( $R_0$ ) es un parámetro epidemiológico que representa el promedio de infecciones secundarias generadas por un individuo infectado en una población completamente susceptible, en ausencia de intervenciones de control (Delamater et al., 2019). Este valor es fundamental para estimar el potencial de propagación de un agente infeccioso (Wu et al., 2020; Yan et al., 2020).

El impacto de la COVID-19 ha sido patente en múltiples dimensiones: la salud pública ha sido severamente afectada, con hospitales saturados y un aumento en la prevalencia de enfermedades crónicas y mentales. La economía global ha sufrido recesiones, y se han producido cambios significativos en el comportamiento social y en las dinámicas laborales (Baker et al., 2020). La rápida propagación de la enfermedad y su gravedad indujo una investigación acelerada para el desarrollo de

vacunas y tratamientos, destacando la importancia de la colaboración internacional en la ciencia y la salud pública (Ranney et al., 2020).

## 2. Desarrollo de Vacunas Contra COVID-19

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19 se desarrollaron múltiples plataformas de vacunas para combatir al SARS-CoV-2, cada una con sus características y mecanismos de acción propios. Las vacunas de ARNm, como las de Pfizer-BioNTech y Moderna, utilizan una porción del material genético del virus (ARN mensajero) para inducir la expresión de la proteína S del virus en las células del individuo vacunado, lo que desencadena una respuesta inmune específica (Baden et al., 2021; Polack et al., 2020). Por otro lado, las vacunas de vectores virales, como las de AstraZeneca y Johnson & Johnson, emplean un virus diferente (no patógeno) para transportar el material genético de la proteína S a las células humanas, induciendo así una respuesta inmune derivada de la expresión transitoria de la proteína S en las células del individuo vacunado pero sin causar la enfermedad (Sadoff et al., 2021; Voysey et al., 2021). También existen vacunas que utilizan virus inactivados, como las de Sinovac y Sinopharm, que utilizan virus muertos para estimular la inmunidad (Guo et al., 2021), y vacunas de proteínas recombinantes, como la de Novavax, que combinan la proteína S recombinante con un adyuvante para mejorar la respuesta inmune (Heath et al., 2021).

La emergencia sanitaria provocada por la COVID-19 llevó a un desarrollo acelerado de vacunas sin precedentes. La colaboración global entre gobiernos, empresas farmacéuticas y organizaciones de salud permitió movilizar recursos y reducir significativamente los tiempos de desarrollo. Iniciativas como COVAX se establecieron para asegurar el acceso equitativo a las vacunas en todo el mundo (COVAX, n.d.), y las fases de ensayos clínicos se llevaron a cabo de manera simultánea en lugar de secuencial, lo que permitió una evaluación más rápida de la seguridad y eficacia de las vacunas (Slaoui & Hepburn, 2020).

Sin embargo, a medida que el SARS-CoV-2 se propagó, surgieron varias variantes de preocupación (VOC) que generaron inquietudes sobre la eficacia de las vacunas. Las variantes más notables incluyen la alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351), gamma (P.1) y ómicron (B.1.1.529). Estas variantes mostraron cambios en la transmisibilidad y la capacidad de evadir la respuesta inmune inducida por las vacunas (Tegally et al., 2020; P. Wang et al., 2021). Por ejemplo, la variante ómicron ha demostrado ser significativamente más transmisible que las variantes anteriores y ha mostrado una capacidad reducida para neutralizarse con anticuerpos generados por las vacunas de ARNm, aunque estas todavía ofrecen una protección considerable contra enfermedades graves y hospitalizaciones (Britton et al., 2022). Esto ha llevado a la necesidad de adaptar las vacunas y considerar dosis de refuerzo para mantener una protección adecuada (Faria et al., 2021).

### 3. Desafíos en la Vacunación

La vacunación ha sido una de las herramientas más efectivas en la lucha contra enfermedades infecciosas, incluido la COVID-19. Sin embargo, a medida que la pandemia por COVID-19 fue evolucionado, surgieron desafíos significativos en términos de la accesibilidad y la eficacia de las vacunas disponibles. A pesar de que varias vacunas contra SARS-CoV-2 recibieron rápidamente la autorización para uso de emergencia y mostraron una alta eficacia para reducir la severidad de la enfermedad y la hospitalización, su eficacia en la prevención de la infección y la transmisión del virus ha mostrado limitaciones notables. Se ha reportado que aunque las vacunas de ARNm, como las de Pfizer-BioNTech y Moderna, logran inducir respuestas inmunitarias robustas, su capacidad para prevenir la infección asintomática y la transmisión entre individuos puede verse reducida frente a ciertas variantes del SARS-CoV-2. En particular, algunas VOI y VUM, que presentan mutaciones en la proteína S, han mostrado potencial para disminuir la eficacia de la neutralización por anticuerpos, lo que podría comprometer parcialmente la protección conferida por estas vacunas (Dai & Gao, 2021; McLean et al., 2022).

La eficacia de las vacunas actuales se ve afectada no solo por la aparición de variantes que pueden evadir parcialmente la respuesta inmune inducida por las vacunas, sino también por la duración limitada de la inmunidad. La disminución de los niveles de anticuerpos con el tiempo ha llevado a la necesidad de dosis de refuerzo, lo que plantea preguntas sobre la sostenibilidad de las estrategias de vacunación a largo plazo. Además, se ha observado que las vacunas tienen una eficacia variable en diferentes grupos demográficos, lo que sugiere que ciertos individuos pueden no responder de manera óptima a la inmunización (European Medicines Agency, 2021; U.S. Food and Drug Administration, 2021).

Ante estos desafíos, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias de vacunación que vayan más allá de las formulaciones actuales. Una de las áreas prometedoras de investigación es el uso de antígenos racionalmente diseñados que puedan mejorar la capacidad de las vacunas para inducir respuestas inmunitarias más amplias y duraderas. Estos antígenos se centran en epítomos específicos que son conservados entre diferentes variantes del virus, lo que podría proporcionar una protección más efectiva contra la infección y la transmisión (Ng et al., 2022). Además, la administración mucosal de vacunas, ya sea por vía oral o intranasal, ha sido identificada como una estrategia potencial para mejorar la respuesta inmune en las mucosas, donde los virus suelen entrar al organismo. Este enfoque tiene el potencial de inducir respuestas inmunitarias tanto sistémicas como locales, lo que podría reducir la transmisión del virus y proporcionar una protección más efectiva en las poblaciones, sobre todo en términos de prevenir la infección y la transmisión entre individuos (Dai & Gao, 2021).

#### 4. AuNP: Propiedades y Aplicaciones

Las AuNP son una plataforma prometedora en el ámbito de la nanomedicina y la biotecnología. Su singular conjunto de propiedades fisicoquímicas, que incluye un tamaño ajustable, una amplia gama de formas, una química superficial que permite su funcionalización eficiente con biomoléculas y sus características ópticas y térmicas

únicas, las convierte en herramientas versátiles para diversas aplicaciones, desde la terapia del cáncer hasta el desarrollo de vacunas. Este apartado examina en detalle las propiedades físicoquímicas de las AuNP y sus aplicaciones en el campo biomédico.

Propiedades Físicoquímicas de las AuNP:

*Tamaño, Forma, y Carga Superficial*

El tamaño y la forma de las AuNP son determinantes clave en sus propiedades ópticas y en su interacción con sistemas biológicos. Las AuNP pueden ser sintetizadas en un rango de tamaños que va desde menos de 1 nm hasta más de 150 nm, y su forma puede variar desde esférica hasta cúbica, cilíndrica o incluso en forma de estrella (L. Dykman & Khlebtsov, 2012).

Los estudios han demostrado que las AuNP esféricas de aproximadamente 15 nm exhiben un color rojo intenso debido a la resonancia plasmónica superficial (SPR), mientras que las nanopartículas más grandes tienden a mostrar un desplazamiento hacia el rojo en su espectro de absorción (Huergo et al., 2022). Esta propiedad óptica ha sido aprovechada en aplicaciones de imagenología, donde las AuNP se utilizan como agentes de contraste en técnicas como la tomografía computarizada (CT) y la resonancia magnética (MRI) (Anik et al., 2022).

La carga superficial de las AuNP también es un factor determinante en su estabilidad y en su interacción con las células. Las AuNP pueden ser funcionalizadas para tener cargas positivas o negativas, lo que influye en su comportamiento en medios biológicos. Por ejemplo, la carga negativa generada por la adsorción de citrato en la superficie de las AuNP permite una mejor dispersión en soluciones acuosas, mientras que la modificación con grupos amino puede conferirles una carga positiva, facilitando la interacción con la superficie celular que posee una carga negativa (Gupta & Rai, 2017).

### *Propiedades Ópticas y Térmicas*

Las propiedades ópticas de las AuNP son principalmente atribuibles a su resonancia plasmónica superficial, que es el fenómeno que ocurre cuando los electrones libres en la superficie de las nanopartículas oscilan en respuesta a la luz incidente. Este fenómeno no solo les otorga un color característico, sino que también permite que las AuNP absorban y dispersan luz de manera eficiente, lo que se traduce en aplicaciones de detección in situ y terapia (Link & El-Sayed, 1999).

Además, las AuNP tienen propiedades térmicas favorables, ya que pueden convertir la energía de la luz en calor. Esta propiedad ha sido utilizada en terapias fototérmicas, donde las AuNP se dirigen a células tumorales y, al ser irradiadas con luz, generan calor suficiente para inducir la muerte celular (Huang & El-Sayed, 2010). Esta capacidad ha sido aplicada para evaluar en ensayos clínicos posibles tratamientos para diversos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el cáncer de próstata, donde se ha demostrado que las AuNP mejoran la eficacia del tratamiento al focalizar el calor en las células malignas (Vines et al., 2019).

### *Biocompatibilidad y Funcionalización Superficial*

La biocompatibilidad de las AuNP es un aspecto crucial para su aplicación en medicina. Aunque las AuNP en su forma nativa son generalmente consideradas biocompatibles, su funcionalización es esencial para mejorar su interacción con células y tejidos (Tiwari et al., 2011). La funcionalización superficial implica la modificación de la superficie de las AuNP con biomoléculas, como péptidos, proteínas o ácidos nucleicos, lo que les confiere propiedades específicas para su aplicación terapéutica o diagnóstica. Sin embargo, esta modificación puede alterar la estabilidad coloidal de las nanopartículas, por lo que es fundamental optimizar las condiciones para mantener su dispersión y funcionalidad.

Por ejemplo, la incorporación de ligandos específicos en la superficie de las AuNP puede facilitar su reconocimiento y captación por las células diana, como las células

presentadoras de antígenos (APC), aumentando así la eficacia de las vacunas basadas en AuNP (Climent et al., 2018). Además, la funcionalización con polietilenglicol (PEG) es común porque mejora la estabilidad de la nanopartícula y prolonga su circulación en el torrente sanguíneo, al mismo tiempo que reduce la reactividad y la respuesta inmune adversa contra el nanomaterial, lo cual es beneficioso para evitar la rápida eliminación y mejorar su eficacia terapéutica (Oh et al., 2011; W. Wang et al., 2013). La modificación con PEG también ha demostrado aumentar la estabilidad de las AuNP en soluciones biológicas, lo que es fundamental para su uso en aplicaciones clínicas.

#### Aplicaciones de las AuNP

Las aplicaciones de las AuNP son diversas y abarcan campos como la terapia del cáncer, la entrega de fármacos, la imagenología biomédica y la vacunación.

#### *Terapia del Cáncer*

Las AuNP han demostrado ser prometedoras en la terapia del cáncer, principalmente por su capacidad de acumularse en tumores y su habilidad para generar calor bajo irradiación (Huang & El-Sayed, 2010). La terapia fototérmica utilizando AuNP ha mostrado resultados promisorios en estudios preclínicos y clínicos, donde se ha observado que las AuNP pueden destruir células tumorales sin dañar los tejidos circundantes (Vines et al., 2019).

Además, las AuNP se están investigando como vehículos para la entrega de medicamentos anticancerígenos, donde su superficie puede ser funcionalizada para liberar fármacos de manera controlada. Este enfoque no solo mejora la biodisponibilidad de los fármacos, sino que también permite la administración dirigida, reduciendo los efectos secundarios asociados con la quimioterapia convencional (Yafout et al., 2021).

### *Entrega de Fármacos*

La entrega de fármacos utilizando AuNP permite mejorar la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica. Las AuNP pueden asociarse a fármacos y liberarlos en un entorno específico, como el microambiente tumoral, lo que minimiza los efectos secundarios en tejidos sanos (Meng et al., 2024). Un ejemplo notable es el uso de AuNP para la entrega de agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina, donde se ha demostrado que las AuNP mejoran la eficacia del tratamiento al aumentar la concentración del fármaco en el sitio tumoral (Hameed et al., 2025).

Además, se han desarrollado sistemas de liberación controlada que utilizan AuNP para administrar simultáneamente múltiples fármacos, lo que puede ser especialmente útil en el tratamiento de enfermedades complejas como el cáncer, donde se requiere una terapia combinada para mejorar la eficacia (Appidi et al., 2025).

### *Imagenología Biomédica*

Las propiedades ópticas de las AuNP también se han explotado en imagenología biomédica. Su capacidad para mejorar el contraste en imágenes de tomografía computarizada (CT) y resonancia magnética (MRI) ha sido ampliamente investigada. Las AuNP pueden ser utilizadas como agentes de contraste debido a su alta densidad, lo que permite una mejor visualización de estructuras biológicas (Ahmadyani et al., 2024).

Por ejemplo, en un estudio reciente, se demostró que las AuNP funcionalizadas con anticuerpos específicos para marcadores tumorales mejoraron significativamente la detección de tumores en modelos animales, lo que sugiere su potencial en la imagenología clínica (Thakur & Sharma, 2024)

### *Vacunación*

Las AuNP se están explorando para dar lugar a una nueva plataforma de desarrollo de vacunas. Su capacidad para presentar antígenos de manera eficiente y estimular

respuestas inmunitarias robustas las convierte en candidatas ideales para la formulación de nanovacunas. Por ejemplo, se ha demostrado que las AuNP funcionalizadas con antígenos específicos pueden inducir respuestas inmunitarias más elevadas en comparación con las vacunas tradicionales (Salazar et al., 2024).

Actualmente, esta tecnología avanza hacia la aplicación clínica, como lo demuestra un estudio de fase I (NCT05605987) que evalúa una vacuna peptídica basada en nanopartículas contra SARS-CoV-2. Este ensayo se centra en evaluar la seguridad, tolerabilidad y la respuesta inmunitaria en voluntarios humanos, representando un paso importante para validar la eficacia y seguridad de las vacunas basadas en AuNP en humanos (ClinicalTrials.gov, 2024).

Además, las AuNP pueden ser utilizadas para mejorar la eficacia de las vacunas mediante la co-administración de adyuvantes. Por ejemplo, la combinación de AuNP con adyuvantes como los oligodesoxirribonucleótidos CpG (CpG ODN), secuencias sintéticas de ADN que contienen motivos no metilados ricos en citosina y guanina reconocidos por los receptores tipo Toll 9 (TLR9), ha demostrado aumentar la respuesta inmune en modelos preclínicos, lo que sugiere que las AuNP pueden ser una herramienta valiosa en el diseño de vacunas más efectivas (Zhao et al., 2024).

#### Mecanismos de Acción de las AuNP en el Sistema Inmunológico

Las AuNP han emergido como herramientas innovadoras en el ámbito de la inmunología, especialmente en el desarrollo de vacunas e inmunoterapias. Su capacidad para interactuar con células del sistema inmune, en particular las DCs, es fundamental para comprender su contribución a la activación de respuestas inmunitarias eficaces. Las DCs son consideradas las principales APC y desempeñan un papel crucial en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa. La interacción de las AuNP con estas células se produce a través de varios mecanismos que incluyen la endocitosis y la fagocitosis, lo que permite a las AuNP ser internalizadas de manera eficiente. Esta internalización promueve la maduración de

las DC, un proceso caracterizado por la expresión aumentada de moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86, así como la producción de citocinas proinflamatorias, que son esenciales para la activación de linfocitos T (Alobaid et al., 2024). La activación de las DCs no solo facilita la presentación de antígenos, sino que también influye en la polarización de la respuesta inmune, permitiendo que se dirija hacia un perfil Th1 o Th2, dependiendo del contexto del antígeno y del adyuvante utilizado (You, 2024).

La capacidad de las AuNP para estimular la respuesta humoral y celular del sistema inmunológico es otro aspecto clave que sustenta su uso como plataforma vacunal. La respuesta humoral se refiere a la producción de anticuerpos por parte de las células B, que son esenciales para neutralizar patógenos y prevenir infecciones. Las AuNP pueden actuar como adyuvantes que incrementan la eficacia de las vacunas al promover la activación de las células B y facilitar la producción de anticuerpos específicos. Esto se logra mediante la presentación de epítopos en la superficie de las AuNP, lo que potencia la interacción con los receptores de las células B y, en consecuencia, la activación de estas células (L. A. Dykman & Khlebtsov, 2017; Li et al., 2020a). En estudios recientes, se ha demostrado que las AuNP pueden aumentar significativamente la producción de anticuerpos IgG en modelos murinos cuando se utilizan en combinación con antígenos específicos, lo que indica su capacidad para mejorar la respuesta inmune adaptativa (Li et al., 2020b).

Por otro lado, la respuesta celular implica la activación de linfocitos T, que son cruciales para la eliminación de células infectadas y la regulación de la respuesta inmune. Las AuNP, al ser reconocidas por las DCs resultan en una mejora en la presentación del antígeno a los linfocitos T, detonando la proliferación y diferenciación de estas células en subtipos efectores, como las células T citotóxicas y las células T colaboradoras (helper), que son fundamentales para una respuesta inmune adaptativa eficaz (Chauhan et al., 2021; Est-Witte et al., 2021). Las investigaciones han mostrado que la administración de AuNP conjugadas con péptidos antigénicos puede inducir una

respuesta robusta de células T CD8+ en modelos murinos, lo que sugiere que estas nanopartículas no solo actúan como vehículos de entrega, sino que también pueden influir en la calidad de la respuesta inmune, favoreciendo tanto la respuesta humoral como celular, ambas críticas para la protección contra infecciones virales (Horwitz et al., 2021; Q. Zhou et al., 2016).

La mejora de la respuesta inmune inducida por las AuNP también se traduce en una memoria inmunológica más robusta, un componente esencial del sistema inmunológico adaptativo que permite al organismo responder de manera más rápida y eficaz ante reexposiciones al mismo patógeno. La capacidad de las AuNP para inducir una respuesta de memoria se relaciona con su habilidad para generar una activación sostenida de las células T y B, lo que resulta en la formación de células de memoria de larga duración. Estas células son capaces de persistir en el organismo durante años y proporcionar protección a largo plazo contra infecciones (Kang et al., 2021; Dai y Gao, 2021). El uso de AuNP en formulaciones de vacunas puede optimizar la duración y la calidad de la memoria inmunológica, lo que representa un avance significativo en el diseño de estrategias vacunales efectivas. En un estudio reciente, se observó que la vacunación con AuNP que portaban antígenos específicos no solo inducía una respuesta inmune primaria, sino que también resultaba en una mayor cantidad de células T de memoria en comparación con las formulaciones tradicionales (Ng et al., 2022).

El diseño racional de vacunas que incorporan AuNP ha llevado a la exploración de diferentes estrategias de formulación, incluyendo la modificación de la superficie de las nanopartículas con ligandos que mejoran la captación por células inmunitarias o que proporcionan señales coestimuladoras adicionales. Por ejemplo, la funcionalización de AuNP con péptidos que activan receptores tipo Toll (TLR) ha mostrado un aumento en la activación de DC y una mejora en la producción de anticuerpos (Climent et al., 2018; Shinci et al., 2019). Este enfoque no solo amplifica la respuesta inmune, sino que también permite un enfoque más dirigido en el

tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer, donde la especificidad de la respuesta inmune es crucial.

## 5 AuNP en el Desarrollo de Vacunas

Las AuNP han emergido como una plataforma innovadora en el desarrollo de vacunas, debido a sus propiedades físicas y químicas únicas que las hacen ideales para ser utilizadas como portadoras de antígenos y adyuvantes. Esta sección explora las características que hacen a las AuNP adecuadas para el desarrollo de nanovacunas, su papel en la mejora de la presentación antigénica, ejemplos de estudios que respaldan su eficacia y las ventajas que ofrecen sobre otros nanomateriales.

### Propiedades de las AuNP Como Vehículos de Antígenos

Las AuNP presentan un conjunto de propiedades que las convierten en vehículos de antígenos altamente efectivos. Su tamaño, que puede ser ajustado entre 1 y 150 nm, permite una mayor interacción con las células del sistema inmunológico, como las APC. Esta capacidad de modificación de tamaño es crucial para optimizar la captación y el procesamiento del antígeno (Dykman & Khlebtsov, 2012; Huang et al., 2020). Por ejemplo, se ha demostrado que las AuNP con tamaños entre 10 y 50 nm son más eficaces para ser internalizadas por las APC, lo que resulta en una presentación más eficiente del antígeno a los linfocitos T (Niikura et al., 2013).

La alta relación superficie-volumen de las AuNP permite alcanzar altas capacidades de carga de las biomoléculas de interés. La unión de los antígenos de interés se puede mediar por una adsorción física o bien mediante la formación de enlaces covalentes (Shinchi et al., 2021). Esta funcionalización no solo mejora la estabilidad del antígeno, sino que también incrementa su biodisponibilidad, lo que se traduce en una respuesta inmunitaria más robusta. Por ejemplo, la funcionalización de AuNP con péptidos específicos ha demostrado aumentar la activación de linfocitos T, lo que sugiere que estas nanopartículas pueden ser diseñadas para inducir respuestas inmunitarias más específicas y efectivas (Zhang et al., 2016).

Otro aspecto relevante es la biocompatibilidad de las AuNP, que ha sido ampliamente documentada, lo que las convierte en una opción segura para aplicaciones biomédicas (Bae et al., 2014). Esta biocompatibilidad reduce el riesgo de efectos adversos, lo que es esencial para su uso en vacunas. Además, las AuNP pueden ser diseñadas para liberar el antígeno de manera controlada, lo que permite una exposición prolongada del sistema inmunológico al antígeno y, por lo tanto, una respuesta inmunitaria más robusta (Zhang et al., 2016).

La posibilidad de modificar la superficie de las AuNP con grupos funcionales específicos también permite mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de los antígenos, aumentando así su inmunogenicidad. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de grupos funcionales que interactúan con receptores específicos en las APC, tales como manósidos, puede aumentar significativamente la captación de las AuNP y, como resultado, mejorar la presentación del antígeno (Climent et al., 2018). Esto es particularmente importante en el contexto de vacunas que requieren una respuesta inmunitaria robusta y duradera.

#### Uso de AuNP como Adyuvantes

Las AuNP no solo actúan como vehículos para la entrega de antígenos, sino que también funcionan como inmunoestimulantes, potenciando la respuesta inmunitaria. Su capacidad para inducir la activación del sistema inmunológico se debe a la activación de vías de señalización en las células inmunitarias, lo que resulta en una producción aumentada de citocinas y una mayor activación de linfocitos T (Huang et al., 2006; Khan et al., 2020). Por ejemplo, se ha demostrado que las AuNP funcionalizadas con oligodeoxinucleótidos CpG inducen respuestas inmunitarias más robustas en comparación con antígenos administrados solos, lo que resalta su eficacia como adyuvantes (Almeida et al., 2015).

Un estudio específico demostró que la administración de AuNP junto con un antígeno de la influenza A H1N1 no solo aumentó la producción de anticuerpos IgG, sino que

también mejoró la respuesta de células T CD4+ y CD8+ (Kumar et al., 2021). Esto sugiere que las AuNP no solo actúan como vehículos, sino que también pueden mejorar significativamente la eficacia de las vacunas al actuar como inmunoestimulantes.

Además, las AuNP mejoran la presentación antigénica facilitando la internalización del antígeno en las APC. Estas nanopartículas pueden ser diseñadas para dirigirse específicamente a receptores en la superficie de las APC, aumentando así la eficiencia en la captura y procesamiento del antígeno (Climent et al., 2019). Este mecanismo es fundamental para inducir respuestas inmunitarias efectivas, especialmente en el contexto de vacunas contra enfermedades infecciosas y cáncer.

Un ejemplo adicional se observa en el uso de AuNP en la formulación de vacunas contra el cáncer, donde se ha demostrado que estas nanopartículas pueden activar el sistema inmunológico para atacar a las células tumorales. Se ha reportado una vacuna basada en AuNP para inducir una respuesta inmune contra células de melanoma, resultando en una disminución significativa del crecimiento tumoral en modelos murinos (Zhang et al., 2021). Este enfoque no solo mejora la eficacia de la vacuna, sino que también puede reducir los efectos secundarios asociados con tratamientos convencionales.

Además, se ha investigado el uso de AuNP en combinación con otros adyuvantes tradicionales, como el hidróxido de aluminio (HA), para mejorar aún más la respuesta inmunitaria. En estos estudios, se observó que la combinación de AuNP y el HA resultó en una respuesta inmune sinérgica, lo que sugiere que las AuNP pueden ser una herramienta valiosa para optimizar las formulaciones de vacunas existentes (Huang et al., 2020).

## Ejemplos de Eficacia de las AuNP en Vacunas

Numerosos estudios han demostrado la eficacia de las AuNP en el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, un estudio pionero utilizó AuNP para la entrega de ADN plasmídico en ratones BALB/c, lo que resultó en un incremento significativo en las respuestas humorales y celulares, evidenciado por un aumento en los títulos de IgG y en la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Huang et al., 2006). Este estudio no solo demostró la capacidad de las AuNP para actuar como vehículos de antígenos, sino que también subrayó su potencial para inducir respuestas inmunitarias robustas a través de la entrega eficiente de material genético.

Investigaciones recientes han explorado el uso de AuNP para desarrollar nanovacunas contra el SARS-CoV-2, donde se observó que estas formulaciones inducían una respuesta inmune robusta, incluyendo la producción de anticuerpos neutralizantes y la activación de células T (Kumar et al., 2021). En este contexto, las AuNP fueron utilizadas para mediar la entrega de antígenos específicos del virus, mejorando la estabilidad de la vacuna y prolongando la respuesta inmunitaria.

En el campo de la oncología, se ha demostrado que las AuNP aumentan la infiltración de linfocitos T en tumores y mejoran la eficacia del tratamiento. En un estudio realizado por Zhang et al. (2021), se utilizó una formulación de AuNP para administrar un antígeno tumoral en combinación con un adyuvante, lo que resultó en una respuesta inmune significativa y una reducción en el tamaño del tumor en modelos de ratón. Este enfoque no solo demuestra la eficacia de las AuNP en la inmunoterapia del cáncer, sino que también resalta su capacidad para mejorar las respuestas inmunitarias en un contexto terapéutico.

Un estudio de Climent et al. (2019) mostró que las AuNP funcionalizadas con antígenos de virus también pueden aumentar la respuesta inmune, lo que subraya su potencial en la creación de vacunas efectivas y seguras. En este caso, se utilizó una formulación de AuNP para presentar antígenos del virus de la inmunodeficiencia

humana (VIH), lo que resultó en una mayor producción de anticuerpos y una respuesta de células T más fuerte en comparación con la administración de antígenos solos.

Además, se ha investigado el uso de AuNP en la formulación de vacunas contra la malaria, donde se demostró que estas nanopartículas podían mejorar la presentación de antígenos y la activación de células T, lo que resultó en una mayor eficacia de la vacuna (Huang et al., 2020). Estos estudios resaltan la versatilidad de las AuNP en el desarrollo de vacunas para diversas enfermedades infecciosas y su capacidad para mejorar las respuestas inmunitarias en múltiples contextos.

Finalmente, la investigación sobre el uso de AuNP en vacunas contra enfermedades autoinmunitarias también ha mostrado resultados promisorios. Se ha demostrado que las AuNP pueden modular la respuesta inmune, lo que podría ser benéfico para el tratamiento de enfermedades en las que la regulación de la inmunidad es crucial (Zhang et al., 2021). Este enfoque innovador abre nuevas posibilidades para el uso de AuNP en la medicina personalizada y en el desarrollo de terapias dirigidas.

#### Ventajas de las AUNP sobre otros nanomateriales

Las AuNP ofrecen varias ventajas sobre otros nanomateriales en el contexto del desarrollo de vacunas. Su biocompatibilidad y baja toxicidad son características ampliamente documentadas, lo que las convierte en una opción atractiva para aplicaciones biomédicas (Bae et al., 2014). En comparación con otros nanomateriales, como las nanopartículas de plata o de sílice, las AuNP presentan un perfil de seguridad más favorable. Además, la capacidad de las AuNP para ser funcionalizadas con una variedad de biomoléculas permite la personalización y optimización de las formulaciones vacunales, lo cual no siempre es posible con otros tipos de nanopartículas (Climent et al., 2019). Esta versatilidad en la modificación superficial permite ajustar las propiedades de las AuNP para maximizar su eficacia como vehículos de antígenos y adyuvantes.

No obstante, es necesario tener en cuenta ciertas limitaciones: la biodistribución de las AuNP tiende a concentrarse en órganos del sistema mononuclear fagocítico — principalmente hígado y bazo— donde pueden acumularse incluso a dosis consideradas seguras. Estudios en ratones han reportado que dosis intravenosas únicas de hasta 1 mg/kg no generan alteraciones histopatológicas significativas tras 14 días (Sadauskas et al., 2007; Sonavane et al., 2008). Sin embargo, evaluaciones a más largo plazo han mostrado que una sola dosis de 1 mg/kg puede generar acumulación persistente en hígado, bazo y riñón durante hasta 120 días, acompañada de signos leves de inflamación o fibrosis (Kang et al., 2011), lo que subraya la importancia de controlar la dosis, la frecuencia de administración y la vía de eliminación para su uso clínico.

## 6. Diseño de Vacunas Basadas en Péptidos

En el ámbito de la inmunología y el desarrollo de vacunas, los péptidos sintéticos son una alternativa a las proteínas completas. El uso de péptidos como antígenos presenta varias ventajas que los hacen atractivos en la formulación de vacunas. En primer lugar, los péptidos sintéticos pueden ser diseñados para incluir únicamente las secuencias específicas que son reconocidas por el sistema inmunológico, lo que permite una respuesta más dirigida y eficiente (Huang et al., 2020). Esta especificidad es crucial para minimizar las reacciones adversas y maximizar la eficacia de la respuesta inmunitaria.

Además, los péptidos sintéticos ofrecen una mayor estabilidad en comparación con las proteínas completas, que pueden ser susceptibles a la degradación y cambios conformacionales. La estabilidad de los péptidos permite una mejor conservación y manejo durante el proceso de formulación y almacenamiento de las vacunas (Kumar et al., 2021). Esta característica es particularmente importante en contextos de vacunación masiva, donde la logística y la durabilidad del producto son fundamentales.

Otra ventaja significativa de los péptidos sintéticos es su producción más sencilla y económica. Existen diversos métodos para su obtención, entre los cuales destaca la síntesis en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés), que permite ensamblar secuencialmente aminoácidos sobre una resina insoluble y facilita la incorporación de modificaciones específicas (Merrifield, 1963; Behrendt et al., 2016). También puede recurrirse a la síntesis en fase líquida, que se utiliza principalmente para péptidos cortos o con requerimientos particulares de pureza, aunque su eficiencia es menor para secuencias largas (Bodanszky & Bodanszky, 1984). Por otro lado, algunos péptidos de interés pueden producirse por métodos recombinantes en sistemas como *Escherichia coli*, mediante la expresión de secuencias génicas diseñadas, lo que puede ser útil para obtener péptidos más largos o con estructuras secundarias complejas (Costa et al., 2014).

La síntesis química de péptidos permite la obtención de grandes cantidades de antígenos a un costo relativamente bajo, lo que se traduce en un acceso más amplio a las vacunas (Zhang et al., 2020). Además, los péptidos pueden ser sometidos a modificaciones que mejoren su inmunogenicidad, tales como la inclusión de secuencias de adyuvantes o la optimización de su longitud.

## 7. Métodos de Conjugación de Péptidos a AuNP y su Caracterización

### *Adsorción Física*

La adsorción física es uno de los métodos más sencillos y rápidos para la conjugación de péptidos a AuNP. Este proceso se basa en interacciones no covalentes, como fuerzas de Van Der Waals y enlaces de hidrógeno, que permiten que los péptidos se adhieran a la superficie de las nanopartículas. Por ejemplo, en un estudio se utilizó la adsorción física para unir un péptido específico de un antígeno viral a AuNP, lo que resultó en una mejora significativa en la activación de células T (Huang et al., 2020). Sin embargo, este método puede presentar desventajas, como la posible desorción del péptido durante el almacenamiento o la administración, lo que podría comprometer la eficacia de la vacuna.

### *Quimisorción y Formación de Enlaces Covalentes*

La quimisorción es un proceso en el cual las moléculas se unen a una superficie mediante la formación de enlaces covalentes, lo que implica una modificación en la estructura electrónica tanto del adsorbato como del adsorbente (Sakono et al., 2019; Xu et al., 2015). A diferencia de la adsorción física, que se basa en interacciones débiles como las fuerzas de Van Der Waals o puentes de hidrógeno, la quimisorción proporciona una unión más fuerte y específica, debido a la formación de enlaces covalentes entre grupos funcionales como tioles (-SH) y la superficie de las AuNP, lo que la hace adecuada para aplicaciones que requieren una presentación estable y controlada del antígeno.

Dependiendo del enfoque experimental, estos enlaces pueden generarse de dos formas principales: (i) mediante el uso directo de grupos funcionales que se quimiosorben espontáneamente a la superficie del oro, como los tioles, fosfonatos o aminas primarias, o bien (ii) a través de reacciones químicas dirigidas que emplean agentes de acoplamiento, como glutaraldehído (GTA), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida), para enlazar grupos funcionales del péptido (por ejemplo, aminas o carboxilos) con la superficie previamente modificada de las AuNP (Hermanson, 2013; Sperling et al., 2008; Conde et al., 2012). Estos agentes de acoplamiento forman enlaces covalentes amida o imina entre los grupos funcionales disponibles, permitiendo una unión más dirigida y permanente.

Este método suele requerir condiciones químicas más controladas, como un pH adecuado (por ejemplo, entre 4.5 y 7.5 dependiendo del sistema), concentración óptima de los reactivos de acoplamiento y tiempos de reacción específicos para evitar reacciones cruzadas, así como posteriores pasos de purificación para eliminar residuos reactivos o productos secundarios no deseados (Hermanson, 2013; Wang et al., 2015).

Ambos enfoques han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de vacunas basadas en AuNP. Por ejemplo, en el estudio de Niu et al. (2017) se empleó la conjugación de un péptido inmunogénico antitumoral mediante quimisorción a AuNP catiónicas, lo que mejoró significativamente la presentación del antígeno, favoreció la captación celular y potenció la respuesta inmune en un modelo murino de melanoma cutáneo.

#### 8. Estudios Preclínicos Sobre el Uso de AuNP Como Plataformas Vacunales Contra SARS-CoV-2

Varios estudios han mostrado que las AuNP pueden mejorar significativamente la respuesta inmune contra SARS-CoV-2. Khaing et al. (2021) investigaron el uso de péptidos derivados de SARS-CoV-2 conjugados a AuNP en un modelo de ratón. Los resultados indicaron que la inmunización con los complejos AuNP-antígenos indujo una respuesta inmune robusta, caracterizada por una producción elevada de anticuerpos IgG específicos y activación de células T. Los ratones vacunados mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos que aquellos que recibieron el antígeno libre, lo que sugiere que las AuNP mejoran la presentación del antígeno y la activación de las células B (Khaing et al., 2021).

Zhang et al. (2022) también contribuyeron al campo con un estudio en el que utilizaron AuNP que contenían el RBD de la proteína S del SARS-CoV-2. Los ratones inmunizados no solo generaron anticuerpos neutralizantes, sino que también mostraron una proliferación significativa de linfocitos T CD4+ y CD8+. Este hallazgo es crucial, ya que las células T son esenciales para la respuesta inmune adaptativa y la protección a largo plazo contra infecciones virales (Zhang et al., 2022).

Chen et al. (2021) demostraron que la formulación de AuNP con epítomos de la proteína S resultó en una respuesta inmune más fuerte en ratones en comparación con las vacunas basadas en proteínas convencionales. Este estudio subraya la capacidad de las AuNP para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos virales.

Un estudio adicional realizado por Wu et al. (2022) mostró que una vacuna basada en AuNP que contenía múltiples epítomos de SARS-CoV-2 resultó en una respuesta inmune más elevada en comparación con una vacuna convencional. Los ratones vacunados mostraron niveles significativamente más altos de anticuerpos IgG y una mayor activación de células T, lo que indica que las AuNP pueden ser una estrategia efectiva para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas contra el SARS-CoV-2 (Wu et al., 2022).

Además, un estudio de Bansal et al. (2021) evaluó el uso de AuNP funcionalizadas con antígenos de SARS-CoV-2 en un modelo de ratón. Los resultados mostraron que la inmunización con estas nanopartículas condujo a una respuesta inmune robusta, con una producción significativa de anticuerpos neutralizantes y activación de células T, lo que sugiere que las AuNP pueden ser efectivas en la creación de vacunas contra SARS-CoV-2 (Bansal et al., 2021).

La respuesta humoral, que implica la producción de anticuerpos por parte de las células B, y la respuesta celular, que involucra la activación de células T, son componentes críticos para una respuesta inmune eficaz contra el SARS-CoV-2. Los estudios preclínicos han demostrado que las AuNP pueden inducir tanto respuestas humorales como celulares, lo que las convierte en herramientas prometedoras para el desarrollo de vacunas.

La comparación de estos estudios indica que las AuNP constituyen una plataforma promisorio para la formulación de vacunas innovadoras contra el SARS-CoV-2. Mientras que las vacunas tradicionales a menudo dependen de un solo antígeno, las AuNP pueden facilitar la presentación de múltiples antígenos, lo que puede resultar en una respuesta inmune más amplia y efectiva. Esta capacidad de las AuNP para mejorar tanto la respuesta humoral como celular es particularmente relevante en el contexto de SARS-CoV-2, donde la variabilidad del virus plantea desafíos significativos para el desarrollo de vacunas duraderas y efectivas.

Los estudios preclínicos han demostrado que las AuNP son plataformas prometedoras para la inducción de respuestas inmunitarias efectivas contra antígenos de SARS-CoV-2. La capacidad de las AuNP para mejorar tanto las respuestas humorales como celular sugiere su potencial como herramientas valiosas en el desarrollo de vacunas. Estos resultados preliminares son alentadores y subrayan la necesidad de continuar investigando el uso de AuNP en la formulación de vacunas para combatir enfermedades infecciosas. La investigación futura debería enfocarse en la optimización de las formulaciones de AuNP y la evaluación de su eficacia en ensayos clínicos, con el objetivo de proporcionar soluciones efectivas y seguras para la prevención de enfermedades virales.

#### 9. Seguridad y Evaluación de Toxicidad de AuNP

La creciente aplicación de AuNP en biomedicina, particularmente en la formulación de vacunas y terapias, ha suscitado un interés considerable en la evaluación de su seguridad y toxicidad. La biocompatibilidad de las AuNP es un factor crítico que determina su viabilidad como agentes terapéuticos y de diagnóstico. En este contexto, múltiples estudios han abordado la evaluación de la biocompatibilidad y la toxicidad de estas nanopartículas, proporcionando información valiosa sobre sus efectos en sistemas biológicos.

La biocompatibilidad de las AuNP se refiere a su capacidad para interactuar con tejidos y células sin inducir respuestas adversas. Investigaciones recientes han demostrado que las AuNP, dependiendo de su tamaño, forma y funcionalización, pueden exhibir diferentes perfiles de biocompatibilidad. Por ejemplo, diversos estudios han indicado que las AuNP más pequeñas tienden a ser más tóxicas que sus contrapartes más grandes, lo que sugiere que el tamaño de las nanopartículas tiene un impacto fundamental en su toxicidad. En particular, nanopartículas con diámetros inferiores a 10 nm han mostrado una mayor capacidad para penetrar en las células, lo que puede llevar a una acumulación intracelular y, potencialmente, a efectos citotóxicos (Huang et al., 2020).

La funcionalización de las AuNP también es un aspecto crucial que afecta su biocompatibilidad. La modificación de la superficie de las nanopartículas con diferentes ligandos, como péptidos, anticuerpos o polímeros, puede mejorar su solubilidad, estabilidad y capacidad de reconocimiento celular. Sin embargo, algunas de estas modificaciones pueden inducir toxicidad, dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales utilizados. Por ejemplo, ciertos grupos funcionales pueden interactuar con componentes celulares, provocando estrés oxidativo o inflamación, lo que subraya la importancia de una cuidadosa selección de ligandos durante el diseño de AuNP para aplicaciones biomédicas (Jiang et al., 2021).

La biodistribución de las AuNP es otro aspecto crítico que se ha investigado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios han demostrado que la biodistribución de las AuNP varía significativamente según su tamaño, forma y funcionalización. En modelos *in vivo*, se ha observado que las AuNP pueden acumularse en órganos como el hígado, el bazo y los pulmones, lo que puede tener implicaciones tanto para la eficacia terapéutica como para la toxicidad. Por ejemplo, las investigaciones han revelado que las AuNP de tamaño más pequeño tienden a ser más biodisponibles y se distribuyen más ampliamente en el organismo, mientras que las AuNP más grandes pueden ser eliminadas más rápidamente a través del sistema reticuloendotelial (Khan et al., 2020).

La evaluación de la toxicidad de las AuNP también ha sido objeto de numerosos estudios. Se han utilizado diferentes enfoques para evaluar la toxicidad, incluyendo ensayos de viabilidad celular, análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estudios histopatológicos. Estos estudios han indicado que la exposición a AuNP puede inducir efectos citotóxicos en diversas líneas celulares, lo que plantea preocupaciones sobre su uso en aplicaciones clínicas. Por ejemplo, un estudio realizado por AshaRani et al. (2009) demostró que las AuNP pueden causar daño en fibroblastos humanos, evidenciando la necesidad de realizar estudios de toxicidad exhaustivos antes de su aplicación clínica.

## 10. Avances Recientes en la Nanotecnología de AuNP

La nanotecnología ha revolucionado el campo de la biomedicina, y las AuNP destacan por su potencial en aplicaciones como la entrega de fármacos, la terapia génica y el desarrollo de vacunas. Recientes innovaciones en la síntesis y diseño de AuNP han permitido mejorar su funcionalidad y eficacia en aplicaciones biomédicas, lo que ha llevado a un incremento en su uso en ensayos clínicos.

Uno de los avances más significativos en la síntesis de AuNP ha sido el desarrollo de métodos de fabricación más eficientes y sostenibles. La síntesis verde, que utiliza extractos de plantas y microorganismos como agentes reductores y estabilizadores, ha ganado atención debido a su bajo impacto ambiental y a la producción de nanopartículas con propiedades mejoradas (Shen et al., 2021). Este enfoque no solo reduce la toxicidad asociada a los reactivos químicos tradicionales, sino que también puede resultar en AuNP con características únicas, como una mejor biocompatibilidad y una mayor capacidad de interacción con células biológicas.

Además, la funcionalización de las AuNP ha sido objeto de intensiva investigación. La modificación de la superficie de las nanopartículas con biomoléculas, como anticuerpos, péptidos o ácidos nucleicos, ha permitido mejorar su especificidad y eficacia en la entrega de fármacos. Por ejemplo, la conjugación de AuNP con anticuerpos específicos ha demostrado ser efectiva en la detección y tratamiento de células tumorales, facilitando la entrega dirigida de agentes terapéuticos (Murray et al., 2020). Esta capacidad de las AuNP para ser funcionalizadas de manera versátil abre nuevas posibilidades para su uso en la medicina personalizada.

En el ámbito de la inmunización, las AuNP han sido ampliamente exploradas como plataformas para la entrega de antígenos virales, mostrando una mejora significativa en la activación del sistema inmune. Zhang et al. (2022) demostraron que AuNP conjugadas con antígenos del SARS-CoV-2 inducen respuestas inmunitarias más intensas y duraderas en modelos murinos en comparación con vacunas

convencionales. Esta ventaja se atribuye a su capacidad de presentar múltiples epítopos de forma organizada, lo que favorece la activación eficiente de células inmunes.

Asimismo, se han investigado combinaciones innovadoras entre AuNP y vacunas basadas en ARN mensajero (ARNm). Dutta et al. (2021) reportaron que las AuNP pueden actuar como adyuvantes estabilizando el ARNm y facilitando su entrega a células diana, lo que optimiza la respuesta inmunológica y permite reducir la dosis de ARNm necesaria. Además, su aplicación en terapias combinadas, como la fototerapia asistida por luz infrarroja cercana, ha mostrado resultados prometedores en oncología. Huang et al. (2020) documentaron que, al acumularse en tejidos tumorales, las AuNP pueden ser activadas para incrementar la permeabilidad celular, potenciando la acción de fármacos quimioterapéuticos y mejorando la eficacia global del tratamiento.

## JUSTIFICACIÓN

El diseño de vacunas contra el SARS-CoV-2 debe implementarse rápidamente para producir candidatos de próxima generación como una ruta alternativa para inducir respuestas inmunes óptimas con formulaciones vacunales desarrolladas con tecnologías propias y accesibles. Se ha descubierto que las AuNP son útiles en una amplia gama de aplicaciones, como la administración y liberación controlada de una variedad de agentes que incluyen medicamentos contra el cáncer, antibióticos, péptidos y ácidos nucleicos. En este contexto, el uso de AuNP como vehículos es prometedor para el desarrollo de vacunas basadas en epítopos en la modalidad de péptidos sintéticos debido al potencial adyuvante de este nanomaterial. Sin embargo, el uso de AuNP ha generado incertidumbre relativa a su posible toxicidad debido a la posibilidad de que las propiedades fisicoquímicas a nanoescala podrían resultar en una mayor reactividad con los sistemas biológicos.

Por lo tanto, en este trabajo se propone evaluar el potencial inmunogénico de cinco péptidos derivados de la proteína S distribuidos espacialmente en las subunidades S1 y S2, conjugados individualmente con AuNP y administrados por vía subcutánea en ratones BALB/c, así como evaluar los efectos nanotoxicológicos que las AuNP en su función adyuvante podrían inducir *in vivo* e *in vitro*.

## HIPÓTESIS

La bioconjugación de péptidos inmunogénicos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2 a AuNP de 25 nm potenciará significativamente la respuesta inmunitaria humoral en ratones BALB/c, en comparación con los péptidos libres, sin inducir efectos citotóxicos ni inflamatorios relevantes *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

### Hipótesis específicas:

1. Las AuNP de 25 nm sintetizadas mediante el método de Frens, funcionalizadas con PEG y bioconjugadas con péptidos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2, conservarán propiedades fisicoquímicas adecuadas para su uso como plataforma vacunal.
2. Los bioconjugados AuNP-péptido inducirán una respuesta inmune humoral significativamente mayor en ratones BALB/c en comparación con los péptidos libres.
3. Los bioconjugados AuNP-péptido favorecerán la maduración de DCs *in vitro*, evidenciada por el aumento de marcadores de activación y secreción de citocinas.
4. Las AuNP bioconjugadas serán internalizadas eficientemente por DCs, facilitando la presentación antigénica.
5. La administración subcutánea de los bioconjugados AuNP-péptido en ratones BALB/c no producirá efectos tóxicos evidentes, como alteraciones histológicas en órganos clave y en el sitio de administración.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Desarrollar cinco bioconjugados de AuNP que contengan péptidos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2 y evaluar su potencial inmunogénico y su bioseguridad en ratones.

### Objetivos Específicos

- Sintetizar AuNP de 25 nm por el método de Frens (1973), el cual se basa en la reducción de  $Au^{3+}$  a  $Au^0$  utilizando citrato como agente reductor y estabilizador.
- Bioconjugar AuNP con los péptidos P1, P2, P3, P4 y P5, utilizando PEG heterobifuncional como ligando y GTA como agente de entrecruzamiento.
- Caracterizar los bioconjugados de oro para determinar su morfología (TEM), tamaño hidrodinámico (DLS), potencial  $\zeta$  y modificación de superficie (FTIR y TGA).
- Determinar la inmunogenicidad de los conjugados en ratones BALB/c en términos de la inducción de respuestas humorales.
- Evaluar la biodistribución, la localización subcelular y los efectos toxicológicos de los conjugados analizando el contenido de oro en los tejidos, estudios de imágenes y determinando marcadores de inflamación, estrés oxidativo y daño tisular.

## METODOLOGÍA

### Selección de antígenos

Se seleccionaron cinco epítomos lineales de la proteína S basándose en una revisión de la literatura de aquellos con potencial para generar anticuerpos neutralizantes (Amrun et al., 2020; Heffron et al., 2020; Li L. et al., 2020; Poh et al., 2020; Pinto et al., 2021). Los péptidos correspondientes a los epítomos seleccionados fueron sintetizados por GenScript Biotech (Piscataway, NJ), y sus secuencias y propiedades fisicoquímicas se detallan en la Tabla 1:

*Tabla 1. Características fisicoquímicas de los péptidos seleccionados.*

| P <sup>a</sup> | Secuencia          | Aminoácidos |      | pI <sup>b</sup> | Longitud (aa) | PM <sup>c</sup> (g/mol) | CN <sup>d</sup> |
|----------------|--------------------|-------------|------|-----------------|---------------|-------------------------|-----------------|
|                |                    | Inicio      | Fin  |                 |               |                         |                 |
| P1             | TESNKKFLPFQQFGRDIA | 553         | 570  | 8.9             | 18            | 2126.37                 | 1               |
| P2             | HADQLTPTWRVYSTGSNV | 625         | 643  | 7.1             | 18            | 2032.17                 | 0.5             |
| P3             | SYQTQTNSPRRA       | 673         | 685  | 10.8            | 12            | 1988.11                 | 2               |
| P4             | PDPSKRFSIEDLLFNKV  | 810         | 827  | 7.2             | 16            | 1408.48                 | 0               |
| P5             | DSFKEELDKYFKNHTS   | 1146        | 1161 | 4.5             | 16            | 2005.27                 | -2.5            |

<sup>a</sup> Péptido derivado de proteína S.

<sup>b</sup> Punto isoeléctrico (Innovagen, 2014).

<sup>c</sup> Peso molecular (Innovagen, 2014).

<sup>d</sup> Carga neta a pH 7 (Innovagen, 2014).

### Síntesis de AuNP

La síntesis de AuNP se realizó mediante el método de Turkevich modificado por Frens (Xia et al., 2009). Para ello se prepararon soluciones al 5 % de HAuCl<sub>4</sub> y Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 24 h antes de su uso para asegurar que los reactivos estuvieran completamente especiados.

Para la síntesis, se preparó una mezcla de reacción con un 1 % de cada precursor, que se mantuvo protegida de la luz durante 5 min. Esta mezcla se vertió rápidamente en un matraz con agua hirviendo para alcanzar una concentración final de 0.05 % y se mantuvo en reflujo por 20 min. La suspensión coloidal obtenida se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su posterior uso. Las soluciones se prepararon con agua milli-Q, y el matraz se lavó con agua regia antes de usarlo.

#### Cálculo de la Concentración de Oro Coloidal

Para conocer la cantidad total de AuNP en el volumen de reacción final, los cálculos se hicieron asumiendo que el 100 % del oro añadido se redujo de Au<sup>+3</sup> a Au<sup>0</sup> para la formación de nanopartículas esféricas.

Sabiendo que el peso molecular de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> es de 339.785 g/mol y que de este únicamente 196.97 g/mol corresponden al oro en el compuesto, se pudo calcular la fracción reactiva de oro por molécula de sal áurica. Multiplicando dicha fracción por la masa total de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> empleada en la reacción de síntesis (con base a la concentración de la solución patrón), se obtuvo directamente la cantidad de oro que finalmente se convirtió en nanopartícula (Ecuación (1)).

$$m_{Au} = \frac{PM_{Au}}{PM_{H_{Au}Cl_4}} \times m_{H_{Au}Cl_4} \quad (1)$$

Donde:

$m_{Au}$  y  $m_{H_{Au}Cl_4}$  = masa total de Au y H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>, respectivamente.

$PM_{Au}$  y  $PM_{H_{Au}Cl_4}$  = peso molecular de Au y H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>, respectivamente.

El volumen total de oro en la suspensión coloidal se calculó a partir de la densidad del oro (Ecuación 2), cuyo valor es 19.3 g/cm<sup>3</sup> (Brown & Lemay, 1985). Mientras que el volumen de una sola nanopartícula fue calculado con base a una estructura esférica

(Ecuación 3). Una vez teniendo el valor de ambos volúmenes, se dedujo el número de partículas contenidas en la suspensión coloidal como se indica en la Ecuación (4).

$$V_{Au} = \frac{m_{Au}}{\rho_{Au}} \quad (2)$$

$$V_{AuNP} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (3)$$

$$N_{AuNP} = \frac{V_{Au}}{V_{AuNP}} \quad (4)$$

Donde:

$V_{Au}$  = volumen total de Au en la suspensión.

$V_{AuNP}$  = volumen de una nanopartícula esférica.

$\rho_{Au}$  = densidad de Au.

$N_{AuNP}$  = número total de partículas en la suspensión.

La concentración molar de oro coloidal se obtuvo calculando la cantidad de nanopartículas por mililitro (Ecuación (5)) y asumiendo que una nanopartícula equivale a una molécula, cuya relación alude al número de Avogadro para el cálculo final (Ecuación (6)).

$$C_{NP} = \frac{N_{AuNP}}{V_{síntesis}} \quad (5)$$

$$M_{Au} = \frac{C_{NP}}{N_A} \quad (6)$$

Donde:

$C_{NP}$  = cantidad de nanopartículas por mililitro de suspensión.

$V_{síntesis}$  = volumen total de síntesis.

$M_{Au}$  = molaridad de Au coloidal.

$N_A$  = número de Avogadro

## Funcionalización de Superficie

Para la funcionalización se estableció la cantidad de moléculas de ligando SH-PEG5K-NH<sub>2</sub> (PEG) requeridas para cubrir una sola partícula y dejar expuestos grupos funcionales que permitan la unión peptídica. El esquema general del proceso de funcionalización de las AuNP con PEG y posterior bioconjugación con péptidos mediante aminación reductiva se muestra en la Figura 1.

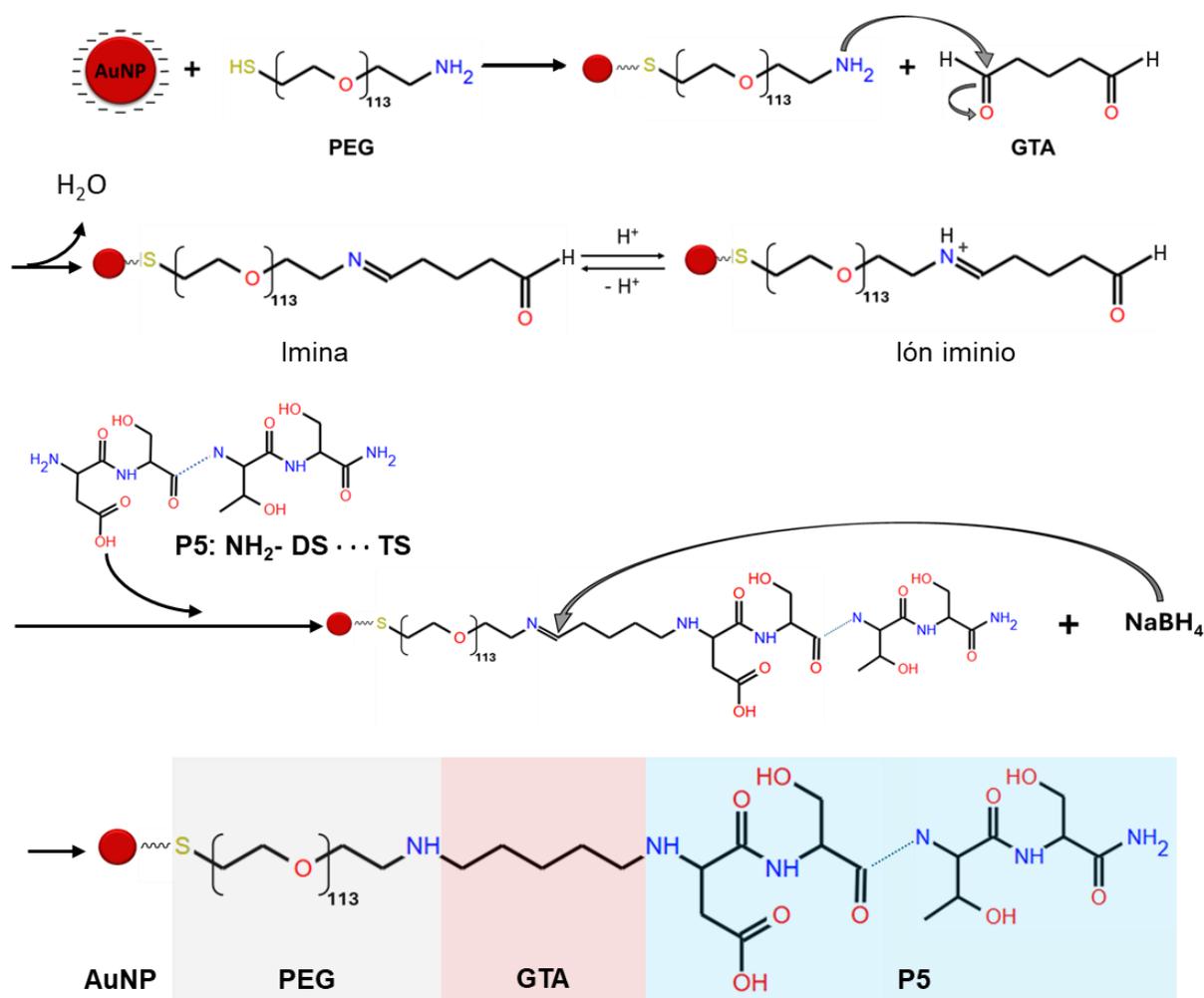


Figura 1. Esquema representativo de la funcionalización de nanopartículas de oro (AuNP) con SH-PEG5K-NH<sub>2</sub>, seguida de la bioconjugación de péptidos por aminación reductiva. La superficie de las AuNP se recubre con PEG terminal amina, proporcionando sitios reactivos para el entrecruzamiento con glutaraldehído (GTA). Posteriormente, el péptido modelo P5 se une a través de sus grupos amina libres, y los enlaces imina formados se estabilizan mediante la reducción con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>). Este procedimiento permite una conjugación estable y orientada, preservando la funcionalidad del péptido.

La cantidad de moléculas de PEG que fue necesaria para cubrir una AuNP ( $N_{\text{PEG}}$ ), se calculó con base a una densidad de recubrimiento de 0.5 PEG/nm<sup>2</sup> (Zirbs et al, 2015), asumiendo que cada molécula de PEG de 5 kDa (orientada de manera perpendicular hacia la superficie de anclaje) ocupa un espacio de 2 nm<sup>2</sup> ( $FP_{\text{PEG5K}}$ ). Mientras que el área de superficie ( $S_{\text{NP}}$ ) para cada tamaño de nanopartícula se calculó partiendo de la fórmula dada para una estructura esférica perfecta. Finalmente, el número de moléculas de PEG requeridas para formar una monocapa a dicha densidad se calculó con las Ecuaciones 7 y 8.

$$S_{\text{NP}} = 4\pi r^2 \quad (7)$$

$$N_{\text{PEG}} = \frac{S_{\text{NP}}}{FP_{\text{PEG5K}}} \quad (8)$$

Con este valor, se calculó la equivalencia en moles de PEG para recubrir 1 mL de nanopartículas (Ecuación (9)) y, finalmente, el volumen requerido en  $\mu\text{L}$  de ligando (Ecuación (10)).

$$\text{mol}_{\text{PEG}}/\text{mL} = \frac{C_{\text{NP}} \times N_{\text{PEG}}}{N_A} \quad (9)$$

$$V_{\text{PEG}} = \left( \frac{PM_{\text{PEG}} \times \text{mol}_{\text{PEG}} \times 1000 \text{ mg/mL}}{C_{\text{STOCK PEG}}} \right) \times 1000 \mu\text{L/mL} \quad (10)$$

Donde:

$PM_{\text{PEG}}$  = Peso molecular de ligando heterobifuncional empleado.

$C_{\text{STOCK PEG}}$  = Concentración de stock de ligando heterobifuncional empleado.

Para la funcionalización de 1 mL de AuNP (previamente dispersada por sonicación durante 1 min) se añadió 5  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M, la cantidad equivalente a cinco monocapas de PEG y Tween 20 (2  $\mu\text{L}$  al 5 %). Esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante toda la noche a 4 rpm a temperatura ambiente. Las AuNP funcionalizadas se lavaron por centrifugación (10 min a 20,000  $\times$  g) dos veces con PBST 1 $\times$  (PBS 1 $\times$  con 0.01 % de

Tween 20). El volumen total de AuNP-PEG se dividió en cinco partes iguales sobre las cuales se realizaron las reacciones individuales de conjugación.

### Estrategia de Bioconjugación

#### Cálculo de Péptido Requerido

Conociendo  $N_{PEG}$ , es posible calcular la cantidad de cada péptido que es necesario añadir para la bioconjugación si se asume que por cada cadena de PEG fijada en la superficie de la nanopartícula corresponde una molécula de péptido ( $N_{PEP} = N_{PEG}$ ). De este modo, los moles de péptido por mililitro de bioconjugado y el volumen a añadir fueron obtenidos de manera similar que para el ligando (Ecuaciones 11 y 12).

$$\text{mol}_{PEP}/\text{mL} = \frac{C_{NP} \times N_{PEP}}{N_A} \quad (11)$$

$$V_{PEP} = \left( \frac{PM_{PEP} \times \text{mol}_{PEP} \times 1000 \text{ mg/mL}}{C_{STOCK PEP}} \right) \times 1000 \mu\text{L/mL} \quad (12)$$

A pesar de que la cantidad de péptido teórica que debería unirse a la nanopartícula es conocida, se agregó el volumen correspondiente a un exceso de cuatro veces (4×) su valor para asegurar que al menos haya una monocapa completa de péptido unido por monocapa de PEG.

Se añadió GTA 100× para el entrecruzamiento de aminos, se dejó reaccionar durante 1 hora con agitación constante a 4 rpm y luego se lavó con PBST. Posteriormente, se añadió el péptido objetivo necesario para formar cuatro monocapas por partícula, se dejó reaccionar durante la noche en agitación constante y, tras un lavado, se añadió  $\text{NaBH}_4$  20× como agente reductor durante 1 h más antes de realizar un último lavado. Este reductor estabiliza los enlaces imina formados entre las aminos y el GTA, convirtiéndolos en enlaces amina secundarios más estables (Migneault et al., 2004). Finalmente, los conjugados se concentraron 20 veces hasta un volumen de 1.5 mL.

### Cuantificación Indirecta de Péptido Unido mediante HPLC

El péptido no unido se cuantificó en los sobrenadantes de reacción de entrecruzamiento con GTA, mediante HPLC en un sistema Agilent Serie 1200. La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> con gradiente lineal (solución A: 0.1 % ácido trifluoroacético en agua / solución B: 0.1 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min durante 10 min. El volumen de inyección fue de 50 µL a una velocidad de inyección de 0.2 mL/min. La longitud de onda de absorción para la detección se estableció en 214 nm, ya que los enlaces peptídicos (enlaces amida), formados por los grupos carbonilo (C=O) y amino (N-H), presentan una fuerte absorción en esta región del espectro UV. Esto permite una detección sensible y general de péptidos, independientemente de su composición de aminoácidos (Kuipers & Gruppen, 2007). Se prepararon curvas de calibración para cada péptido con soluciones estándar en un rango de 25–100 µg/mL. Cada estándar y muestra se centrifugaron durante 2 min a 21,000 × g y la fase superior se recuperó y se transfirió a un vial para su inyección en el sistema HPLC. Se utilizaron controles de péptidos no unidos para cada determinación, con soluciones de péptidos a la concentración agregada para una reacción de conjugación en PBS-T.

### Caracterización de AuNP

#### Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Debido a que la resonancia del plasmón de superficie localizada (LSPR) está altamente relacionada con el tamaño de partícula, la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción máxima en la región visible se determinó mediante espectroscopía UV-Visible, para confirmar las variaciones de tamaño entre las diferentes síntesis y los conjugados. Las medidas de los espectros UV-Vis se efectuaron en la longitud de onda de 400 a 800 nm, empleando celdas desechables de 1 cm de camino óptico en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Ltd., Stone, UK).

### Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Parámetros como el diámetro hidrodinámico (DH), el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial  $\zeta$  se determinaron en un Zetasizer Pro (Malvern Ltd., Malvern, UK). Se configuró el equipo de modo que las condiciones operativas se establecieron para el oro como material en solución con un índice de refracción de 0.183 y absorción de 3.343 (Johnson & Christy, 1972). Mientras que, para el agua, como material dispersante, la temperatura de trabajo se estableció a 25 °C con una viscosidad de 0.8872 cP, índice de refracción de 1.33 y constante dieléctrica de 78.5. Cada muestra se ajustó a 1 unidad de absorbancia midiendo a 520 nm en PBS 1× y todas las mediciones automatizadas se realizaron en una celda capilar plegada desechable DTS1070 que permitió la determinación simultánea de los parámetros antes mencionados con un volumen de muestra que se ajustó a 800  $\mu$ L con el material dispersante.

### Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El análisis morfológico y la distribución de tamaño de nanopartícula se realizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en una unidad JEM-JEOL-2100 a 200 kV. Se realizó una dilución 1:200 de la suspensión de AuNP recubiertas con citrato en agua desionizada para preparar la muestra. Se depositaron 5  $\mu$ L de la muestra sobre una rejilla recubierta de níquel formvar/carbono durante 10 min y se dejó secar durante 24 h en un desecador. Para la distribución de tamaños se consideró el diámetro de 700 nanopartículas y las micrografías se procesaron con el software ImageJ versión 1.53e, NIH, EE. UU (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

### Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización de las moléculas de superficie correspondientes a la funcionalización y conjugación de péptidos se realizó mediante FTIR. Para cada muestra se tomó una alícuota equivalente a 1 mg de oro, se concentró a un volumen de 50  $\mu$ L, en un tubo eppendorf de 1 mL, se depositó sobre una superficie de silicona antiadherente y se colocó en un desecador durante 24 h. La muestra seca se transfirió cuidadosamente al equipo

con la ayuda de una espátula fina y los espectros se registraron en la región de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  con un total de 254 escaneos, en un equipo Nicolet iS10 con accesorio de muestreo Smart iTX ATR.

#### Análisis Termogravimétrico

Se realizaron mediciones termogravimétricas (TGA) con un analizador TGA-550 (TA Instruments, New Castle, DE). Las muestras de AuNP con citrato, funcionalizadas o conjugadas se concentraron de manera similar al análisis FTIR, usando una alícuota de 3 mg de oro en 50  $\mu\text{L}$ . La tasa de calentamiento fue de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  y el rango de temperatura fue de 30 a  $600^\circ\text{C}$ .

#### Estudios *in vitro*

##### Evaluación de Citotoxicidad

La citotoxicidad de los conjugados se evaluó mediante el ensayo de resazurina. Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de suero bovino fetal, a  $37^\circ\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ , utilizando placas T75 hasta confluencia. Un día antes de la evaluación de citotoxicidad, se sembraron  $1 \times 10^4$  células por triplicado en una placa de cultivo de 96 pocillos. Las células control se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 mM) o sin estímulo. Las células se expusieron a AuNP funcionalizadas con PEG (AuNP-PEG) o una mezcla de los cinco conjugados AuNP-P1 a AuNP-P5 (AuNP-mpS) en un rango de concentración de 0.1 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24, 48 y 72 h en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Para evaluar la actividad metabólica, se determinó la viabilidad celular basada en la reducción de resazurina a resofurina en el punto final del tratamiento. Las células fueron expuestas a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resazurina durante 3 h y se registró la fluorescencia (560 nm/590 nm) en un dispositivo FlexStation II (LabX).

## Ensayo de internalización celular

En un experimento separado, las DCs fueron cultivadas bajo las condiciones previamente mencionadas y expuestas a AuNP-PEG, conjugados individuales (AuNP-P2, AuNP-P3, AuNP-P5) o solo medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) como control. Después de 3 o 6 h de incubación, el medio fue retirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1×. Posteriormente, las células fueron fijadas con una solución a base de aldehídos (4 % formaldehído, 0.05 % GTA, 0.1 M de cacodilato de sodio a pH 7.2 y 0.2 % de ácido pícrico) durante 48 h a temperatura ambiente. La solución fijadora se reemplazó por cacodilato de sodio 0.1 M y las muestras se almacenaron a 4 °C para su procesamiento. Para el análisis de internalización celular, las células se lavaron tres veces durante 10 min con cacodilato de sodio 0.1 M y luego fueron fijadas secundariamente con tetraóxido de osmio al 1 % durante 60 min. Las muestras se lavaron dos veces con cacodilato de sodio y se contrastaron con acetato de uranilo al 0.5 % durante 10 min. Después, las muestras fueron lavadas tres veces con acetato de sodio y agua destilada. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una serie de etanol de concentración creciente (del 35 al 100 %) y embebidas en resina EMBED 812 durante 48 h a 55 °C.

Las secciones de piel de los ratones inmunizados con los bioconjugados de AuNP o Al(OH)<sub>3</sub>-mpS fueron sumergidas en una solución fijadora a base de aldehído durante 2 h a temperatura ambiente, luego se almacenaron a 4 °C durante 72 h. Posteriormente, los tejidos fueron transferidos a tubos con 3 mL de cacodilato de sodio 0.1 M y procesados de forma similar a las DCs hasta la etapa de deshidratación con etanol. Después de la deshidratación, las muestras fueron lavadas tres veces durante 10 min con óxido de propileno y se incubaron durante la noche en una mezcla 1:1 de resina y óxido de propileno. Luego de un nuevo lavado, las muestras fueron embebidas en resina durante 48 h a 55 °C.

Se obtuvieron secciones ultrafinas de 75 nm utilizando un ultramicrotomo LEICA EM UC7 con una cuchilla de diamante DiATOME ultra 45°. Las secciones fueron transferidas a

rejillas de cobre y se les aplicó una segunda tinción con metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo). Finalmente, las rejillas se dejaron secar sobre papel filtro en una placa de Petri con sílice durante 8 h antes de ser observadas con un microscopio electrónico de transmisión JEM-JEOL-2100 operado a 200 kV. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el software ImageJ 1.53e (NIH, Bethesda, MD).

#### Determinación de marcadores de maduración en DCs mediante citometría de flujo

El efecto de los conjugados de oro en la maduración de las células DC2.4 se evaluó mediante citometría de flujo. Primero, se sembraron  $3 \times 10^6$  células en 2 mL de medio RPMI completo (suplementado con 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de aminoácidos no esenciales MEM, 10 mM de HEPES, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina y 2 % de SBF) en placas de 60 mm y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h antes de agregar los conjugados. Las células se lavaron una vez con 1× PBS y se trataron con AuNP-PEG (50  $\mu$ g/mL), LPS (100 ng/mL) o con medio RPMI completo como control sin estímulo (SE) durante 24 h. Las células DC2.4 se lavaron, se resuspendieron en PBS 1× suplementado con 5 % SBF y la concentración se ajustó a  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Para un marcado simple y para los controles de isotipo, se colocaron  $2.5 \times 10^5$  células SE y  $2.5 \times 10^5$  células tratadas con LPS en cada pocillo.

Los receptores Fc CD16 y CD32 se bloquearon en todas las muestras con 25  $\mu$ L de anti-CD16/32 durante 30 min en hielo, se lavaron dos veces por centrifugación (1,200 rpm/5 min a 4 °C) y se marcaron durante 25 min con los anticuerpos. Finalmente, las células se lavaron una vez, se resuspendieron en PFA al 1 % en PBS y se almacenaron a 4 °C. Durante todo el proceso, las células se mantuvieron en hielo y protegidas de la exposición a la luz. Los anticuerpos y sus controles de isotipo utilizados fueron: anti-CD11c conjugado con isotiocianato (FITC) (control de isotipo IgG de hámster armenio FITC), anti-CD86 conjugado con ficoeritrina (PE) (control de isotipo IgG2a de rata PE), anti-CD40 conjugado con alofococianina (APC) (control de isotipo IgG2b de rata APC) y anti-MHC clase II conjugado con estreptavidina-PerCP/Cyanine5.5 (control de isotipo IgG de hámster armenio PerCP/Cyanine5.5) (control de isotipo IgG de hámster armenio

PerCP/Cyanine5.5) (control de isotipo IgG2b de rata biotina). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo-Fisher) y se analizaron con el software FlowJo v.10 (BD Biosciences, Ashland, OR).

#### Perfil de citocinas en DCs

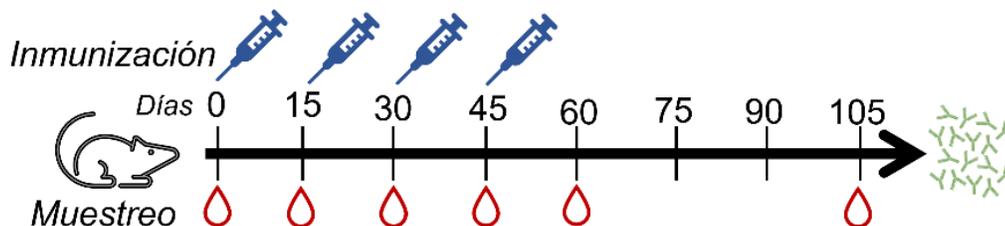
Para la cuantificación de citocinas, se sembraron DCs en un experimento independiente bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Después de 24 h de incubación, se les realizó un lavado con PBS 1× y se trataron con 50 µg Au/mL de AuNP-PEG o AuNP-mpS. Después de 24 h de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta el análisis. Los niveles de citocinas fueron evaluados mediante el BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, siguiendo el protocolo del fabricante. Los datos se adquirieron utilizando un citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo-Fisher) y se procesaron con el software FlowJo v.10 (BD Biosciences, Ashland, OR).

#### Estudios *in vivo* en ratones BALB/c

##### Ensayo de inmunización

El protocolo descrito a continuación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) con registro: CEID 2018-03. Se formaron grupos de ratones BALB/c hembras (8-10 semanas de edad, n = 5) para recibir uno de los siguientes tratamientos: mezcla de péptidos en adyuvante Al(OH)<sub>3</sub> a dosis baja (HA mpS L, 5 µg de cada péptido) o dosis alta (HA mpS H, 15 µg de cada péptido), una mezcla de los cinco péptidos en PBST (5 µg) o los conjugados AuNP-P1, AuNP-P2, AuNP-P3, AuNP-P4, AuNP-P5 (correspondientes a 5 µg de cada péptido). Se administraron cuatro dosis subcutáneas (100 µL) en intervalos de dos semanas (días 1, 15, 30 y 45). Se obtuvieron 200 µL de sangre periférica mediante punción de la cola un día antes de cada inmunización y dos semanas o dos meses después de la última inmunización, como se muestra en la Figura 2. Los sueros se separaron mediante

centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.



*Figura 2. Esquema de inmunización en ratones BALB/c*

### Ensayo ELISA

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con cada péptido para los grupos de conjugados individuales (150 ng/pocillo), una mezcla de péptidos para los grupos HA (500 ng/pocillo) o con la proteína S (200 ng/pocillo); se diluyeron en tampón de carbonato 0.2 M (pH = 9.6) y se incubaron durante la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron tres lavados con PBST (conteniendo Tween 20 al 0.05 %) después de cada incubación. Las placas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5 % a temperatura ambiente durante 2 h. Se aplicaron diluciones seriadas de los sueros de prueba y se incubaron durante la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para el marcaje secundario, se utilizaron anticuerpos antirratón (IgM, IgG, IgG1 o IgG2a) conjugados con peroxidasa de rábano picante y se incubaron durante 2 h a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La detección se realizó agregando ABTS y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato y la densidad óptica se registró a 405 nm durante 1 h en un fotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan® FC (Thermo Scientific, Waltham, MA).

### Procesamiento de tejidos para análisis histológico y TEM

Transcurridos 60 días desde la última inmunización, los ratones BALB/c de los grupos AuNP-P2, AuNP-P3, AuNP-P5 y  $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-mpS}$  fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajeron los riñones, el hígado y secciones de piel de  $2\text{ mm}^2$ . Los órganos fueron pesados, lavados una vez con solución salina al 0.9 % y conservados en tubos

con 4 mL de paraformaldehído al 4 %. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta que fueron procesadas para análisis histológico. Los órganos y la piel se deshidrataron mediante una serie de lavados con etanol de concentración creciente, del 70 al 100%, seguidos de aclarado en isopropanol (20 min – 20 min – 45 min). Posteriormente, las muestras fueron impregnadas en parafina a 60 °C, en ciclos de 30 min – 30 min – 40 min. Se obtuvieron secciones de 4 micrómetros utilizando un micrótomo y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La segunda sección de piel fue procesada siguiendo el protocolo adecuado para microscopía electrónica de transmisión.

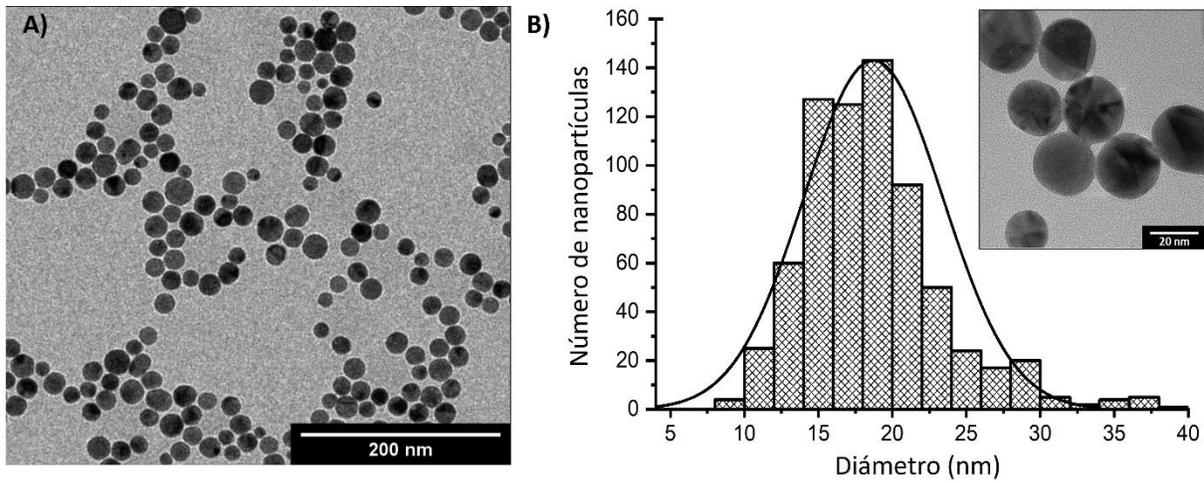
### Análisis estadístico

La significancia estadística se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores p fueron menores a 0.05. Los niveles de significancia se indicaron en las leyendas de las figuras con los siguientes símbolos: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, y \*\*\*p < 0.001. El análisis se llevó a cabo utilizando OriginPro 2021 (OriginLab Corp, Northampton, MA).

## RESULTADOS

### Propiedades fisicoquímicas y morfológicas de los conjugados de oro

El espectro de absorción UV-Vis de las AuNP no modificadas exhibió un pico de absorción ( $\lambda_{\max}$ ) a 520 nm correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie, típica de nanopartículas esféricas de aproximadamente 20 nm (Frens, 1973) y cuyo DH fue de 20.14 nm con un potencial  $\zeta$  de  $-30.20$  mV. Las micrografías TEM confirmaron la morfología esférica de las AuNP y su tamaño real de  $18.70 \pm 4.70$  nm (**Figura 3**).

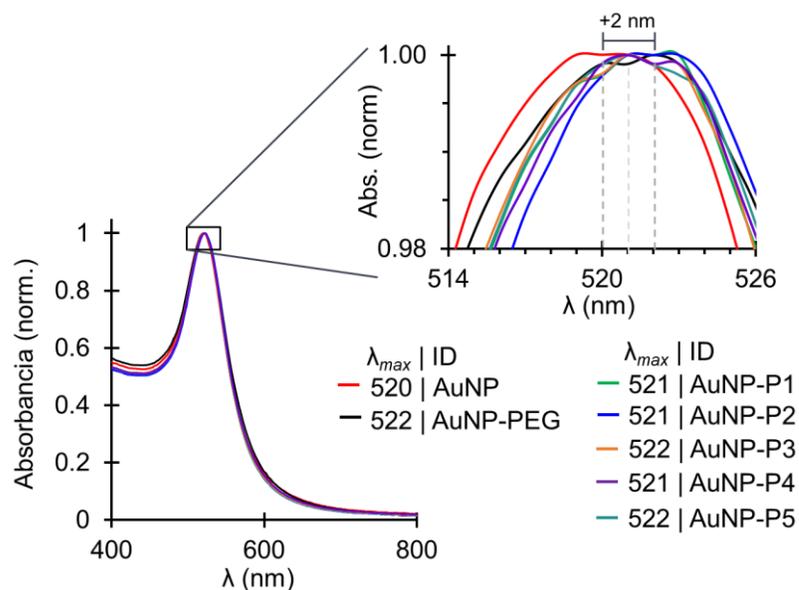


*Figura 3. Micrografía TEM de AuNP a 200 kV (A). Histograma de distribución de tamaño de nanopartículas (n=700 AuNP).*

Una vez funcionalizadas las nanopartículas, el valor  $\lambda_{\max}$  aumentó en 2 nm, lo que se mantuvo en los conjugados AuNP-P3 y AuNP-P5 (Figura 4). Aunque los demás conjugados permanecieron en  $\lambda_{\max}$  de 521 nm, su conjugación fue confirmada por DLS y cambios en el potencial  $\zeta$ .

El DH de las AuNP-PEG tuvo un incremento de 21.62 nm con respecto a las AuNP estabilizadas con citrato y este parámetro aumentó  $31.71 \pm 1.85$  nm más en los conjugados finales (Tabla 2). Las AuNP-P3 tuvieron el DH más pequeño (29.06 nm), lo que podría atribuirse a la longitud del péptido unido, ya que es el péptido más corto. Debido a los grupos amino-terminales, el potencial  $\zeta$  de las AuNP-PEG se volvió más

positivo que el de las AuNP sin modificar, alcanzando un valor de  $-6.39$  mV. El potencial  $\zeta$  final de los conjugados osciló entre  $-11.70$  y  $-5.87$  mV con un PDI medio de  $0.20 \pm 0.04$ , se confirmó tanto la modificación de la superficie como la estabilidad de los sistemas coloidales.



**Figura 4.** Espectro UV-Vis normalizado de AuNP estabilizadas en citrato y su comparación con AuNP funcionalizadas con PEG o conjugadas con los péptidos seleccionados.

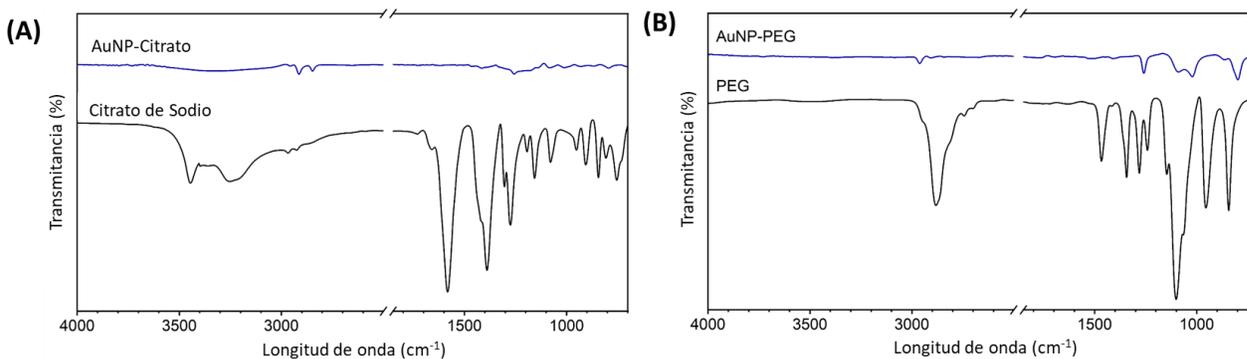
**Tabla 2.** Caracterización por DLS de AuNP estabilizadas con citrato, funcionalizadas con PEG y conjugadas con los péptidos.

| ID       | $\lambda_{max}$ (nm) | FMWH (nm) | DH (nm) | PDI  | $\zeta$ (mV) |
|----------|----------------------|-----------|---------|------|--------------|
| AuNP     | 520                  | 44        | 20.14   | 0.03 | -30.20       |
| AuNP-PEG | 522                  | 46        | 41.76   | 0.54 | -6.39        |
| AuNP-P1  | 521                  | 44        | 52.57   | 0.21 | -6.85        |
| AuNP-P2  | 521                  | 44        | 54.27   | 0.15 | -8.96        |
| AuNP-P3  | 522                  | 44        | 49.20   | 0.21 | -11.70       |
| AuNP-P4  | 521                  | 44        | 51.89   | 0.26 | -5.87        |
| AuNP-P5  | 522                  | 44        | 51.30   | 0.18 | -7.75        |

## Caracterización FTIR

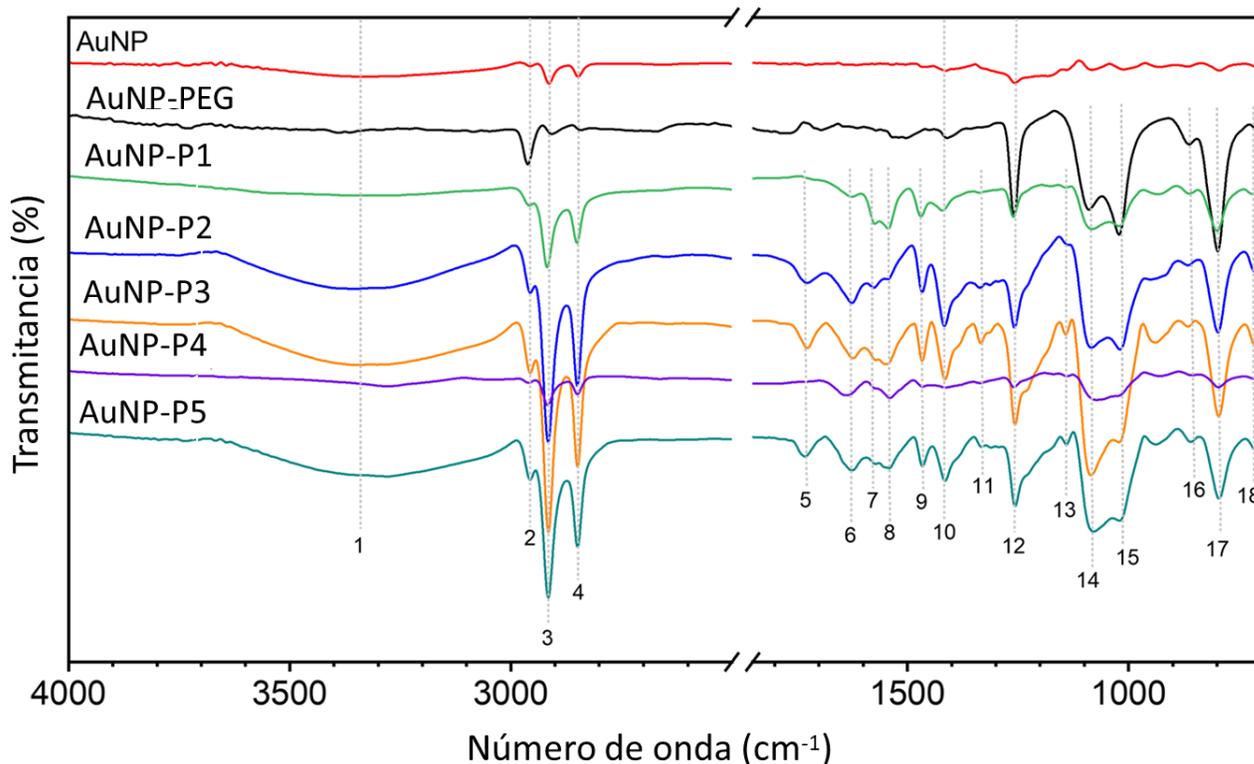
En la Figura 5 se muestran los espectros FTIR de citrato de sodio y HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> en su forma pura, con el objetivo de identificar los grupos funcionales característicos de cada estabilizador. Estas señales permiten confirmar la presencia de enlaces específicos y sirven como referencia para comparar con AuNP funcionalizadas y conjugadas.

Para corroborar la naturaleza del recubrimiento de las AuNP en cada etapa de modificación, se realizó un análisis FTIR en muestras desecadas (Figura 6). El espectro FTIR de las AuNP recubiertas con citrato mostró una banda ancha característica del estiramiento O–H en el rango 3657–3000 cm<sup>-1</sup> (1) y otra a 1415 cm<sup>-1</sup> correspondiente al estiramiento simétrico COO (10), además de dos bandas entre 2912–2845 cm<sup>-1</sup> de estiramiento asimétrico C–H (3) y simétrico (4). El sistema AuNP-PEG mostró bandas adicionales a las de las AuNP recubiertas con citrato que confirmaron el intercambio de ligando superficial. Las bandas principales corresponden al estiramiento C–N de la amina I a 1257 cm<sup>-1</sup> (12), estiramiento C–O de los grupos éter entre 1084–1020 cm<sup>-1</sup> (14 y 15) y la banda de oscilación C–H a 720 cm<sup>-1</sup> (18) conocida como la banda de cadena larga CH<sub>2</sub>. Es importante notar que la formación del enlace S–Au dativo se consolidó con una pequeña banda a 451 cm<sup>-1</sup> (19) y el estiramiento S-C de la cadena polimérica de PEG se localizó con una banda aguda a 794 cm<sup>-1</sup> (17).



**Figura 5.** Espectros FTIR de citrato de sodio (A) y HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> (B) en su forma pura.

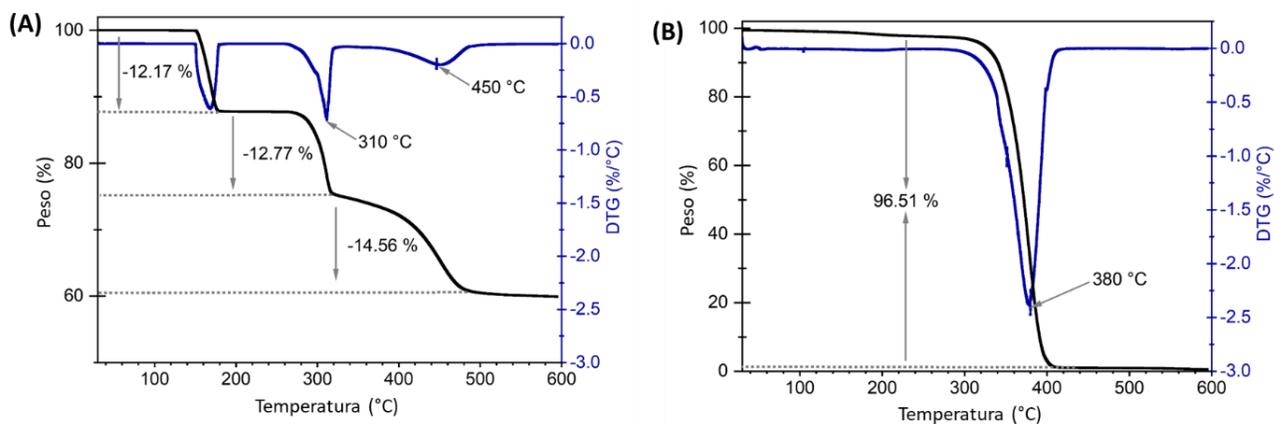
Finalmente, las bandas a  $1725$  y  $1622\text{ cm}^{-1}$  (5 y 6) de estiramiento C=O del ácido carboxílico y amida II, así como a  $1576$  y  $1543\text{ cm}^{-1}$  (7 y 8) de flexión N–H de la amina I y amida II, respectivamente, corroboraron la presencia de péptidos conjugados. Otras bandas encontradas sólo en los conjugados de oro fueron la flexión C–H del grupo metileno ( $1465\text{ cm}^{-1}$ , 9), la flexión O–H de los ácidos carboxílicos ( $1140\text{ cm}^{-1}$ , 13) y del fenol del aminoácido tirosina presente en los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3, y AuNP-P5 ( $1333\text{ cm}^{-1}$ , 11). Además, los aminoácidos exhibieron una fuerte y amplia banda O–H en la región de  $3660\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  del ácido carboxílico y alcoholes de la secuencia de aminoácidos como serina, treonina y tirosina.



**Figura 6.** Espectros FTIR de nanopartículas de oro (AuNP) estabilizadas con citrato (Au0), tras su funcionalización con PEG y posterior conjugación con péptidos (P1 a P5). Las bandas observadas en los espectros corresponden a distintos grupos funcionales, los cuales están detallados en la Tabla A 1 del Anexo.

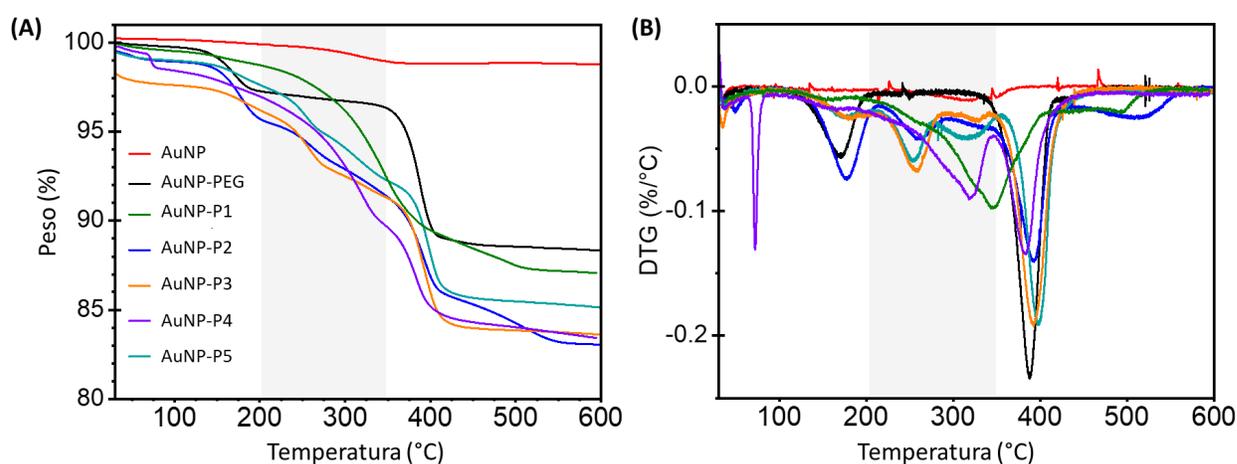
## Análisis Termogravimétrico

Se analizaron muestras de citrato de sodio y HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> para caracterizar la descomposición térmica de cada compuesto y facilitar su comparación con muestras funcionalizadas (Figura 7). La pérdida de peso observada por debajo de los 200 °C se atribuyó a la evaporación del agua residual presente en la muestra. Solo los cambios de masa registrados por encima de esta temperatura se consideraron representativos del contenido orgánico del material. En el termograma correspondiente al citrato de sodio puro, se identificaron tres eventos de pérdida de masa, destacando uno alrededor de 310 °C asociado a su degradación parcial, y otro a 450 °C, vinculado a la descomposición de residuos (Figura 7A) (Marcilla et al., 2018; Liu et al., 2018). Por otro lado, el termograma del HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> puro mostró un pico en la derivada térmica en torno a los 380 °C (Figura 7B), junto con una pérdida de masa del 96.5 %, comportamiento comparable al observado en las AuNP funcionalizadas y conjugadas. Asimismo, se detectaron picos derivados cerca de los 350 y 400 °C, los cuales concuerdan con reportes previos que atribuyen esas pérdidas a la descomposición térmica del PEG (Qian et al., 2017; Lu et al., 2019)



**Figura 7.** Resultados del análisis termogravimétrico (TGA) y de derivada (DTG) de citrato de sodio (A) y HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> (B) en su forma pura, con el objetivo de identificar las señales térmicas correspondientes a los estabilizadores utilizados en la síntesis y funcionalización de AuNP.

Tal como se presenta en la **Figura 8**, las AuNP estabilizadas con citrato mostraron una pérdida de masa del 0.99 % al final del análisis térmico, mientras que las nanopartículas funcionalizadas con PEG exhibieron una pérdida significativamente mayor de material orgánico. A partir de los datos de TGA, se estimó que el contenido de PEG en la muestra funcionalizada fue del 8.3 %, mientras que en las muestras conjugadas fue de  $7.18 \pm 0.98$  %. Estos valores fueron empleados para calcular la densidad del injerto ( $\sigma_{TGA}$ ), siguiendo metodologías previas (Das et al., 2016), con un valor calculado de  $0.62 \pm 0.09$  moléculas/nm<sup>2</sup> (Tabla 3).



**Figura 8.** Resultados del análisis termogravimétrico (A) y de derivada (B) de AuNP estabilizadas con citrato, funcionalizadas con PEG y conjugadas con los péptidos P1 a P5. La banda gris indica el rango de temperatura donde se observó la pérdida de peso atribuida a la descomposición de los péptidos.

En el caso de las AuNP conjugadas, la pérdida total de materia orgánica entre 200 y 600 °C fue de  $12.44 \pm 0.70$  % (equivalente a  $0.36 \pm 0.09$  mg), de la cual un  $5.26 \pm 1.20$  % ( $0.15 \pm 0.01$  mg) correspondió específicamente al péptido conjugado (Tabla A 2 del Anexo). Dado que el análisis por HPLC indicó una cobertura promedio de  $1.14 \pm 0.25$  monocapas de péptido, esta información se utilizó para comparar la cantidad teórica de péptido incorporado en la reacción de conjugación con la masa real detectada por TGA. De acuerdo con el cálculo teórico, se esperaría una incorporación de  $0.12 \pm 0.02$  mg de péptido, mientras que el análisis experimental mostró un contenido de  $0.15 \pm 0.01$  mg

(Tabla 4). Esta cercanía entre los valores teórico y experimental respalda la efectividad del proceso de conjugación empleado.

**Tabla 3.** Densidad de injerto ( $\sigma_{TGA}$ ) de PEG en la superficie de las AuNP.

| Muestra  | $f$ (%) <sup>b</sup> | $\sigma_{TGA}$<br>(moléculas/nm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup> |
|----------|----------------------|---|
| AuNP-PEG | 0.08                 | 0.70  |
| AuNP-P1  | 0.06                 | 0.49  |
| AuNP-P2  | 0.08                 | 0.71  |
| AuNP-P3  | 0.08                 | 0.66  |
| AuNP-P4  | 0.06                 | 0.53  |
| AuNP-P5  | 0.07                 | 0.60  |

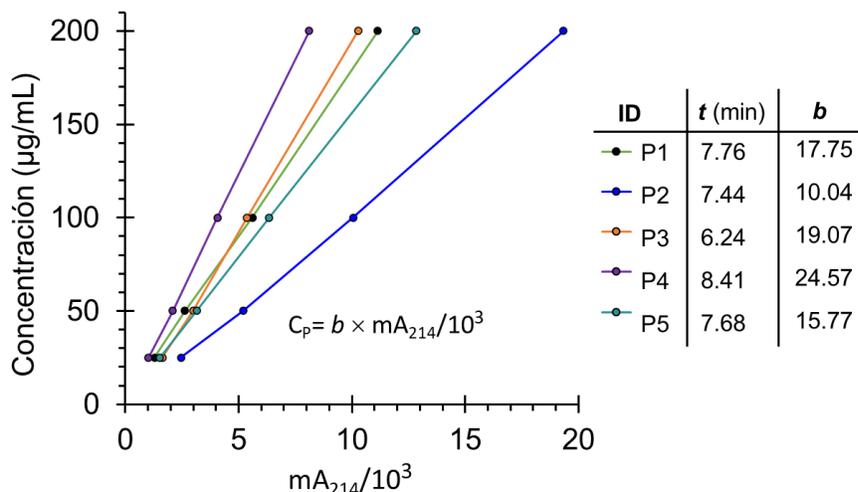
<sup>a</sup>  $\sigma_{TGA} = (f \cdot N_A \cdot D \cdot \rho_{gold}) / ((1 - f) \cdot MW_{PEG} \cdot 6)$ , donde  $f$  es la fracción en peso de los ligandos orgánicos determinada por TGA,  $N_A$  es la constante de Avogadro,  $D$  es el diámetro de una AuNP,  $\rho_{gold} = 19.32 \text{ g/cm}^3$  y  $MW_{PEG} = 5000 \text{ g/mol}$  (Joydeep et al., 2016).

<sup>b</sup> La fracción en peso se calculó a partir de la pérdida de masa atribuida al PEG.

### Determinación de péptido unido

Para determinar la concentración de péptido unido en cada conjugado, se recuperaron y analizaron por RP-HPLC los sobrenadantes que contenían péptido no unido en las reacciones de conjugación. La Figura 9 muestra las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los péptidos analizados mediante HPLC, en un rango de concentración de 25 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Las curvas presentan una relación lineal entre la concentración del péptido y el área del pico cromatográfico, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 0.99 en todos los casos, lo que indica una excelente linealidad del método. Estos resultados validan la precisión y sensibilidad del análisis cromatográfico para cuantificar la concentración de péptidos libres en las muestras. Las pendientes de las

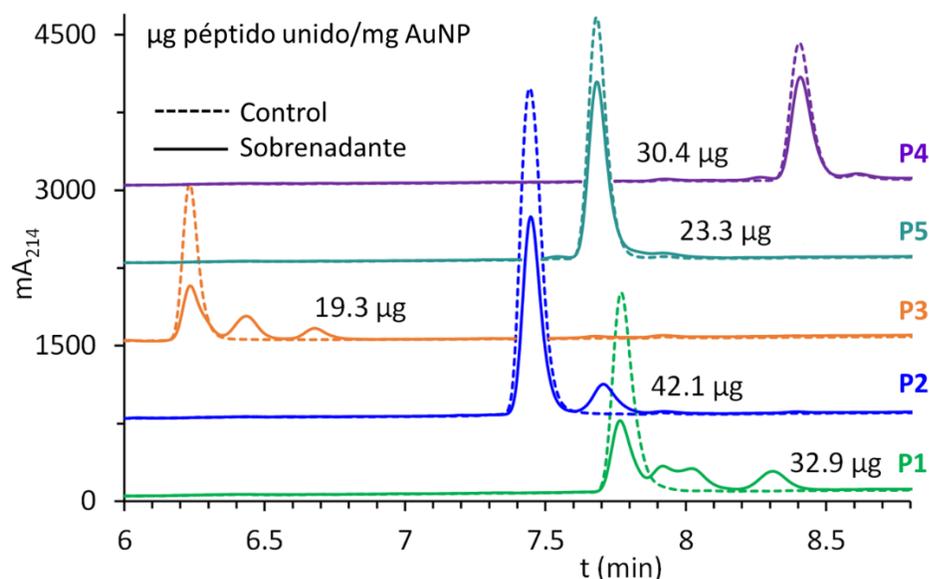
curvas varían ligeramente entre péptidos, reflejando diferencias en su respuesta cromatográfica individual.



**Figura 9.** Curvas de calibración de los péptidos P1 a P5 en un rango de concentración de 25 a 200 µg/mL, cuantificado por HPLC.

Curiosamente, se encontraron múltiples picos con diferentes tiempos de retención en los cromatogramas de los sobrenadantes de P1 (cuatro picos), P2 (dos picos) y P3 (tres picos) que podrían atribuirse a la cantidad de aminas primarias reactivas en su secuencia de aminoácidos (8, 5 y 8 aminas primarias, respectivamente), las cuales podrían participar en las reacciones de reticulación (**Figura 10**). La concentración de péptido no unido se calculó por interpolación de la curva de calibración y se restó de la concentración medida en los controles para determinar la cantidad de péptido unido o restante en la suspensión coloidal.

Como se indica en la Tabla 4, la concentración media de péptido ligado fue de  $84.46 \pm 25.56$  µg/mL de suspensión de AuNP. Considerando que en 1 mL de suspensión de AuNP concentradas  $100 \times$  hay 3 mg de Au<sup>0</sup>, se estimó que la cantidad de péptido por masa de AuNP fue de  $28.15 \pm 9.52$  µg/mg.



**Figura 10.** Cuantificación por HPLC de péptidos P1–P5 en sobrenadantes tras su conjugación con AuNP. La fracción unida ( $\mu\text{g}$  péptido / mg AuNP) se estimó desde la absorbancia a 214 nm y se comparó con la concentración inicial ( $C_0$ ).

**Tabla 4.** Comparación del contenido de péptidos en los conjugados de oro, basada en HPLC y TGA.

| Conjugado | Concentración de muestra control ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup> | Péptido unido ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>b</sup> | Monocapas <sup>c</sup> | Péptido                                    |  | Pérdida de peso de péptido (mg) <sup>d, f</sup> |
|-----------|--|---|------------------------|--|--|---|
|           |  |   |                        | equivalente a 1 monocapa (mg) <sup>d</sup> | Péptido remanente (mg) <sup>d, e</sup> |   |
| AuNP-P1   | 199.44   | 60.30   | 1.21                   | 0.092                                      | 0.11                                   | 0.13  |
| AuNP-P2   | 198.90   | 93.02   | 1.87                   | 0.087                                      | 0.16                                   | 0.16  |
| AuNP-P3   | 199.88   | 130.72  | 2.62                   | 0.061                                      | 0.16                                   | 0.14  |
| AuNP-P4   | 199.99   | 69.99   | 1.40                   | 0.086                                      | 0.12                                   | 0.15  |
| AuNP-P5   | 200.09   | 68.28   | 1.36                   | 0.086                                      | 0.12                                   | 0.15  |

<sup>a</sup> Concentración de control de péptido añadido en exceso (4 veces) a la reacción de conjugación, determinada por HPLC.

<sup>b</sup> Péptido unido a AuNP, determinado por HPLC.

<sup>c</sup> Monocapas de péptidos remanente en conjugados de oro ( $a \cdot b$ ).

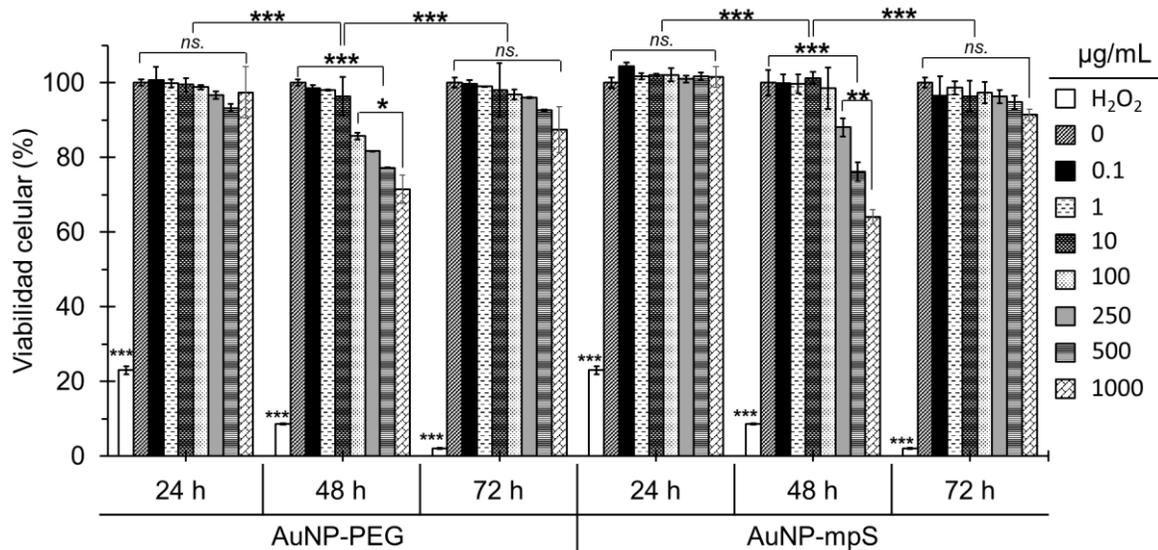
<sup>d</sup> Valores teóricos.

<sup>e</sup> Monocapas  $\times$  péptido equivalente a 1 monocapa.

<sup>f</sup> Pérdida de peso determinada por TGA.

## Evaluación de citotoxicidad

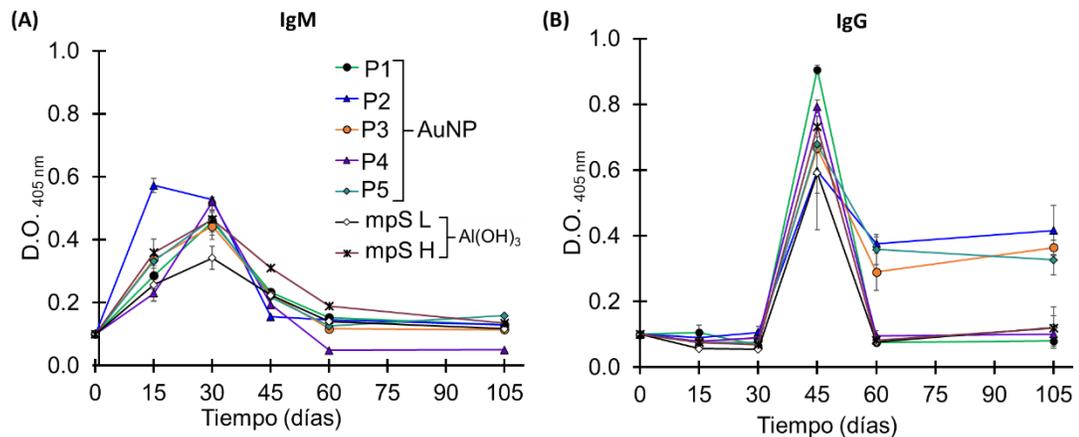
Para comprobar si las AuNP son tóxicas a nivel celular, la línea celular HEK-293T se expuso a un rango de concentraciones de AuNP. La citotoxicidad celular se midió a las 24, 48 y 72 h post-exposición midiendo la actividad metabólica de las células vivas, utilizando el método de reducción de resazurina. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre los tratamientos AuNP-PEG y AuNP-mpS, independientemente de la concentración de nanoconjugados (Figura 11). Después de 24 h de incubación con las nanopartículas funcionalizadas, se observó una ligera disminución de la actividad metabólica a partir de 100 µg/mL; sin embargo, este efecto no fue significativo. Curiosamente, 48 h después de añadir los nanoconjugados se observó una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular desde 100 µg/mL con AuNP-PEG y 250 µg/mL con AuNP-mpS, que continuó disminuyendo hasta el 71% y el 64%, respectivamente, con 1000 µg/mL. Por el contrario, tras 72 h de exposición, la viabilidad celular se recuperó con ambos tratamientos, hasta el 87% con AuNP-PEG y el 91% con AuNP-mpS a la concentración más alta.



**Figura 11.** Evaluación de viabilidad celular en la línea HEK293-T tras exposición a AuNP-PEG y AuNP-mpS. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ns = no significativo).

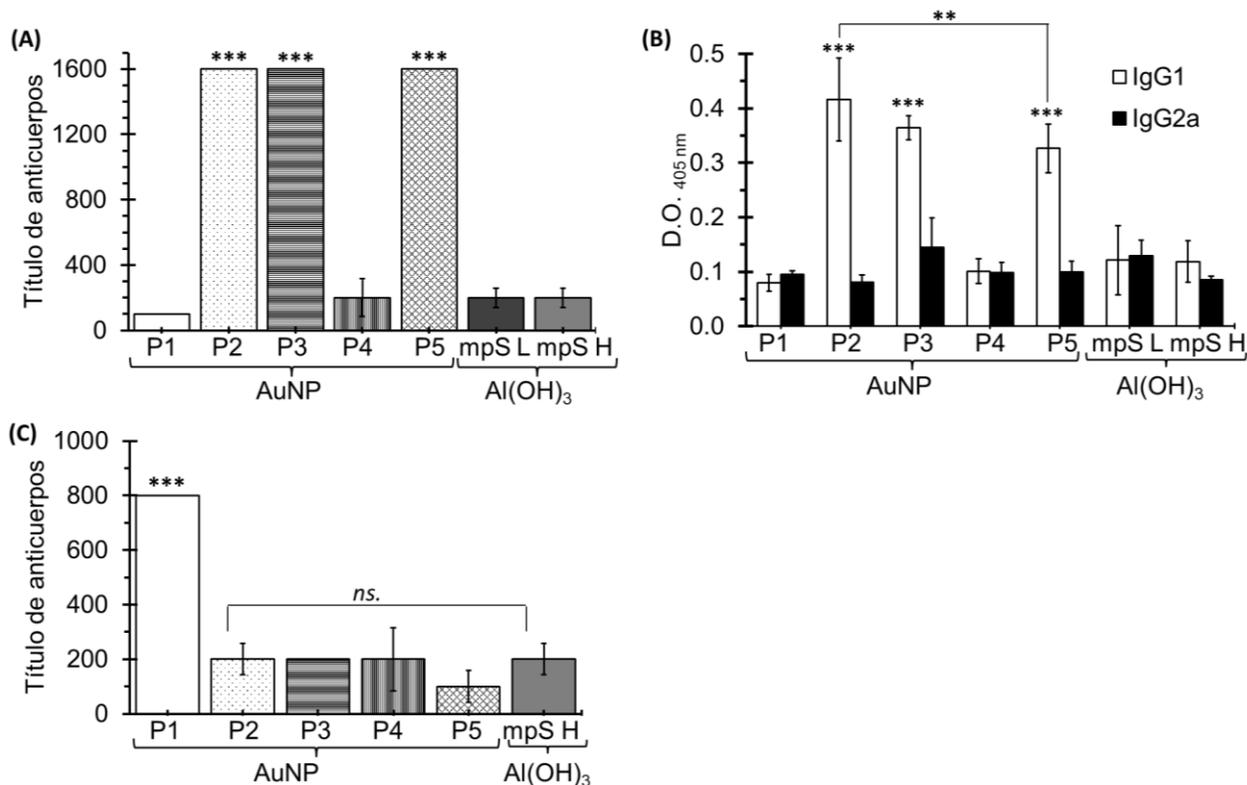
## Evaluación de la respuesta humoral inducida por los conjugados de oro

La capacidad de los conjugados de oro para aumentar la inmunogenicidad de cada péptido se probó administrando por vía subcutánea (s.c.) cada conjugado a ratones de prueba y comparando su respuesta con aquellos que recibieron una mezcla de péptidos co-administrados con un adyuvante de referencia (hidróxido de aluminio, HA). Se observó un aumento de IgM en una etapa temprana después de la primera dosis para todos los tratamientos (péptidos con HA o conjugados a AuNP), alcanzando su concentración máxima el día 30 del esquema de inmunización (Figura 12A). Con relación a la respuesta de IgG, esta se disparó después de la tercera dosis de conjugados o péptidos con HA, alcanzando su pico máximo el día 45 (Figura 12B). Los niveles de anticuerpos anti-P1 y anti-P5, al igual que los generados en los ratones vacunados con la mezcla de péptidos en HA, alcanzaron su punto máximo después de la tercera dosis. Sin embargo, posteriormente estos niveles disminuyeron hasta alcanzar concentraciones apenas detectables, incluso en los grupos que recibieron el adyuvante comercial ( $p < 0.01$ ). Los ratones que recibieron la dosis alta en HA produjeron niveles significativamente más altos de IgM anti-mpS que los ratones del grupo de dosis baja, pero los niveles de IgG no mostraron una correlación con la dosis recibida ( $p < 0.05$ ).



**Figura 12.** Evaluación de inmunogenicidad de péptidos administrados con hidróxido de aluminio o conjugados a AuNP. Niveles séricos de anticuerpos IgM (A) e IgG (B) inducidos en ratones BALB/c inmunizados con conjugados AuNP-P1 a P5 o mezcla peptídica con adyuvante (AH mpS). Anticuerpos detectados por ELISA (dilución 1:200) en distintos tiempos.

Es importante destacar que los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3 y AuNP-P5 indujeron los mayores niveles de anticuerpos IgG, incluso 2 meses después de la última inmunización ( $p < 0.001$ ). Los ratones inmunizados con los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3 y AuNP-P5 alcanzaron los mayores niveles de anticuerpos IgG con respecto a los demás grupos (Figura 13A), en el que predominó la subclase IgG1 sobre la IgG2a (Figura 13B). Mientras que los conjugados AuNP-P1 y AuNP-P4, así como el grupo HA en ambas dosis, alcanzaron niveles de anticuerpos bajos y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos y tampoco en la subclase IgG predominante.

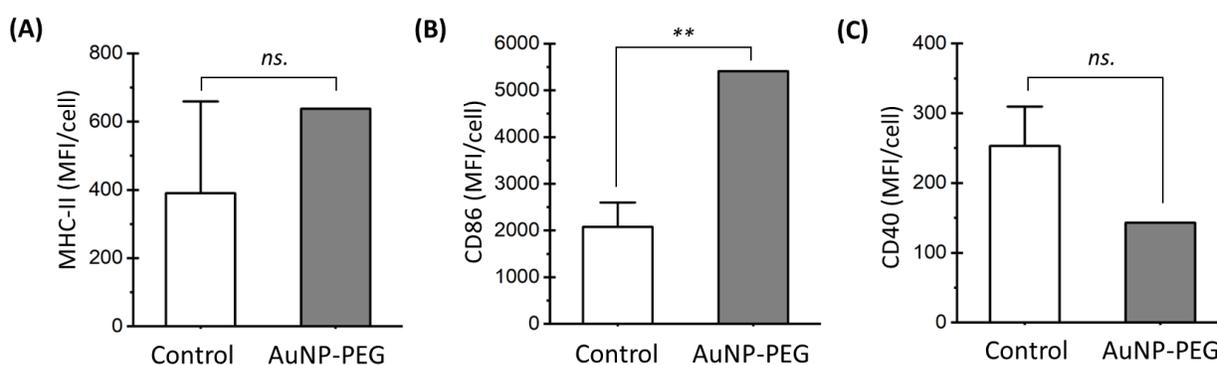


**Figura 13.** Títulos de IgG anti-peptido (A), niveles séricos de IgG1 e IgG2a (B) y títulos de IgG anti-Spike (C) tras inmunización con conjugados individuales o dosis baja/alta de adyuvante HA. Anticuerpos evaluados por ELISA en el día 45. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ns= no significativo).

La capacidad de los anticuerpos inducidos por los conjugados para reconocer los péptidos en condiciones nativas se evaluó mediante un ELISA en el que el antígeno objetivo fue la proteína S completa comercial. Los resultados mostraron que el título de anticuerpos IgG inducido por AuNP-P1, que se unió a la proteína S, fue 8 veces mayor que el obtenido contra P1. En este caso, los anticuerpos inducidos por los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3 y AuNP-P5 revelaron un título menor que el obtenido contra sus péptidos individuales y no representaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a AuNP-P4 y el adyuvante HA con la mezcla de péptidos en dosis alta (15 µg de cada péptido) (Figura 13C).

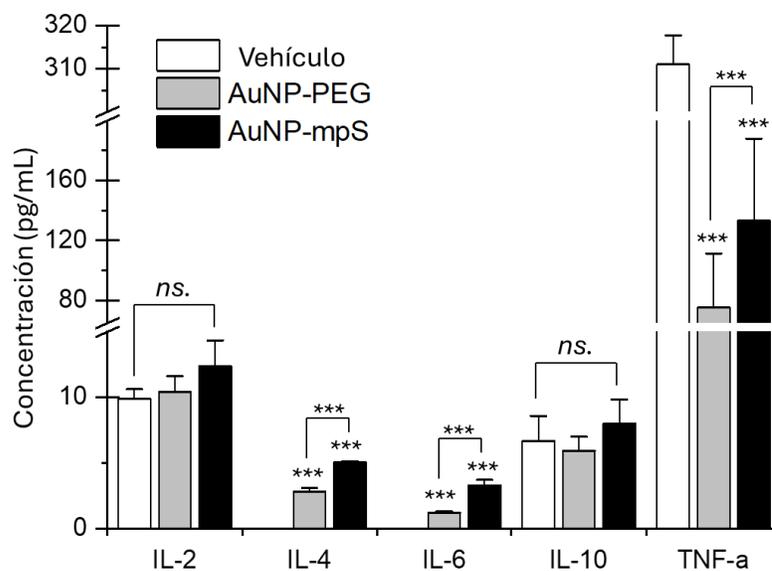
#### Efectos inmunomoduladores de AuNP en DCs: maduración y producción de citocinas

Se evaluó el impacto de las AuNP-PEG en la maduración de las DCs mediante citometría de flujo, utilizando células DC2.4 expuestas durante 24 h a una concentración de 50 µg/mL de AuNP-PEG. En comparación con las células control, que solo recibieron el vehículo, se encontró que las nanopartículas favorecieron la maduración celular al aumentar la expresión de la molécula coestimuladora CD86, mientras que la expresión de CD40 se redujo (Figura 14).



**Figura 14.** Evaluación de la maduración *in vitro* de células dendríticas. Expresión de MHC-II (A), CD86 (B) y CD40 (C) en células DC2.4 tras 24 h de exposición a 50 µg/mL de AuNP-PEG. Resultados expresados como intensidad media de fluorescencia (MFI). ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (\*\* $p < 0.01$ ; ns= no significativo).

En línea con estos resultados, también se analizó el efecto inmunoestimulador de las AuNP en las DCs a través de la producción de citocinas tras el tratamiento con diferentes formulaciones de nanopartículas (Figura 15). El tratamiento con AuNP-mpS provocó un aumento considerable en la liberación de IL-4 e IL-6, en comparación con las células control. Específicamente, los niveles de IL-4 alcanzaron una concentración de 5 pg/mL en el grupo tratado con AuNP-mpS, mientras que el tratamiento con AuNP-PEG mostró un incremento moderado (3.5 pg/mL). De manera similar, la producción de IL-6 fue notablemente mayor en las células tratadas con AuNP-mpS (4 pg/mL), frente a un aumento pequeño con el tratamiento con AuNP-PEG (2 pg/mL). Además, se observó un incremento no significativo en los niveles de IL-2 después del tratamiento con AuNP-mpS o AuNP-PEG. Por otro lado, los niveles de IL-10 no presentaron cambios en alguno de los tratamientos, lo que sugiere que las formulaciones de AuNP no inducen una respuesta inmunosupresora.



**Figura 15.** Efecto de los tratamientos con AuNP en la concentración de citocinas en sobrenadantes de células DC2.4 tras 24 h de tratamiento con 10  $\mu$ g Au/mL de AuNP-mpS, AuNP-PEG o vehículo. ANOVA de dos vías con prueba de Tukey (\*\* $p < 0.001$ ; ns = no significativo).

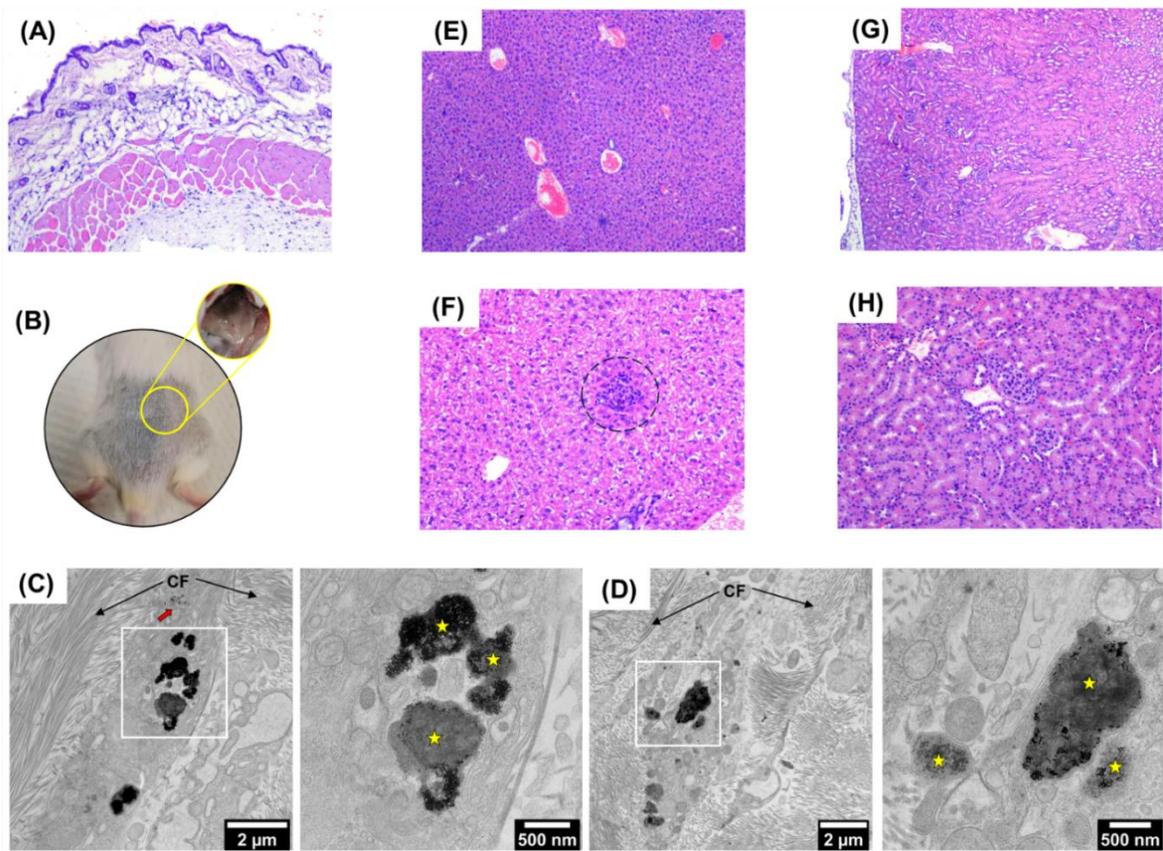
Un hallazgo relevante fue que los niveles de TNF- $\alpha$  se redujeron significativamente en ambos grupos tratados con AuNP, en comparación con las células control. Esta disminución sugiere que las AuNP pueden modular las vías de señalización proinflamatorias, lo cual es consistente con el aumento de IL-4 e IL-6, que están asociados con respuestas inmunitarias del tipo Th2.

#### Efectos histopatológicos de las AuNP en ratones BALB/c

Se llevó a cabo un análisis histológico para determinar los posibles efectos de las AuNP en diferentes tejidos. En las secciones de piel de los ratones tratados con AuNP, no se encontraron alteraciones histopatológicas significativas (Figura 16A). No obstante, se observó una pequeña mancha oscura en el sitio de inyección, lo que sugiere la acumulación de las nanopartículas (Figura 16B). Las micrografías de las secciones dérmicas de los ratones inmunizados mostraron la presencia de AuNP en las células basales de la epidermis, específicamente en los queratinocitos basales situados cerca de las fibras de colágeno (Figura 16C y D). En el hígado, se detectaron infiltrados inflamatorios cerca de la vena centrolobulillar, lo que indica una posible respuesta inmune activa que podría sugerir daño hepático (Figura 16F). En contraste, no se observaron alteraciones histopatológicas en los tejidos renales de los ratones tratados con AuNP (Figura 16H).

#### Captación celular de las AuNP

El análisis ultraestructural de las DCs reveló modificaciones morfológicas asociadas con los tratamientos que incluyeron AuNP-mpS o AuNP-PEG. Las DCs control presentaron una morfología normal, con organelos bien definidos como el núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi y endosomas (Figura 17A). Por otro lado, las DCs expuestas a AuNP-PEG durante 6 h mostraron una notable captación de nanopartículas, evidenciada por su presencia en compartimentos endosomales tanto tempranos como tardíos (Figura 17B).

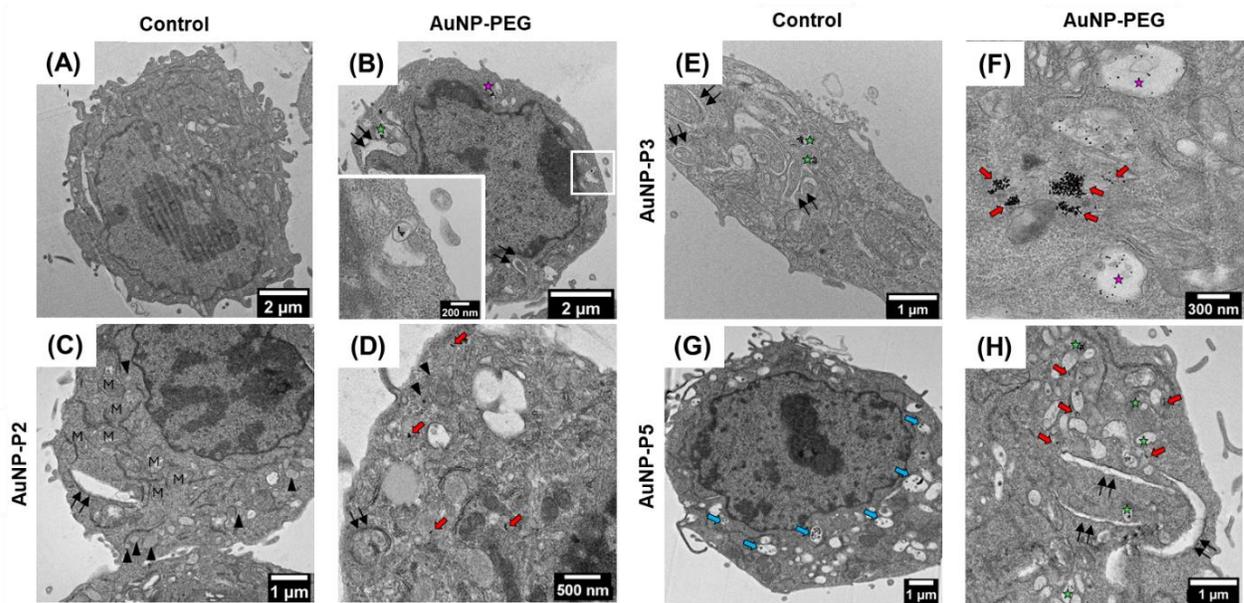


**Figura 16.** Análisis histológico de tejidos de piel, hígado y riñón de ratones BALB/c tratados con nanopartículas de oro (AuNP), utilizando tinción con H&E. Los ratones recibieron cuatro dosis de AuNP-mpS y fueron sacrificados dos meses después para su evaluación. (A) Sección de piel de un ratón tratado sin alteraciones histopatológicas significativas. (B) Pigmentación oscura en el sitio de inyección, con presencia del conjugado de oro; el inserto muestra la cara interna de la piel. (C, D) Micrografías TEM que revelaron acumulación lisosomal (estrellas amarillas) de AuNP en queratinocitos basales, adyacentes a fibras de colágeno (CF) en la epidermis. (E) Sección hepática de un ratón control. (F) Sección hepática de un ratón tratado con AuNPs, mostrando infiltrados inflamatorios cerca de la vena centrolobulillar. (G) Sección renal con estructuras glomerulares y tubulares normales.

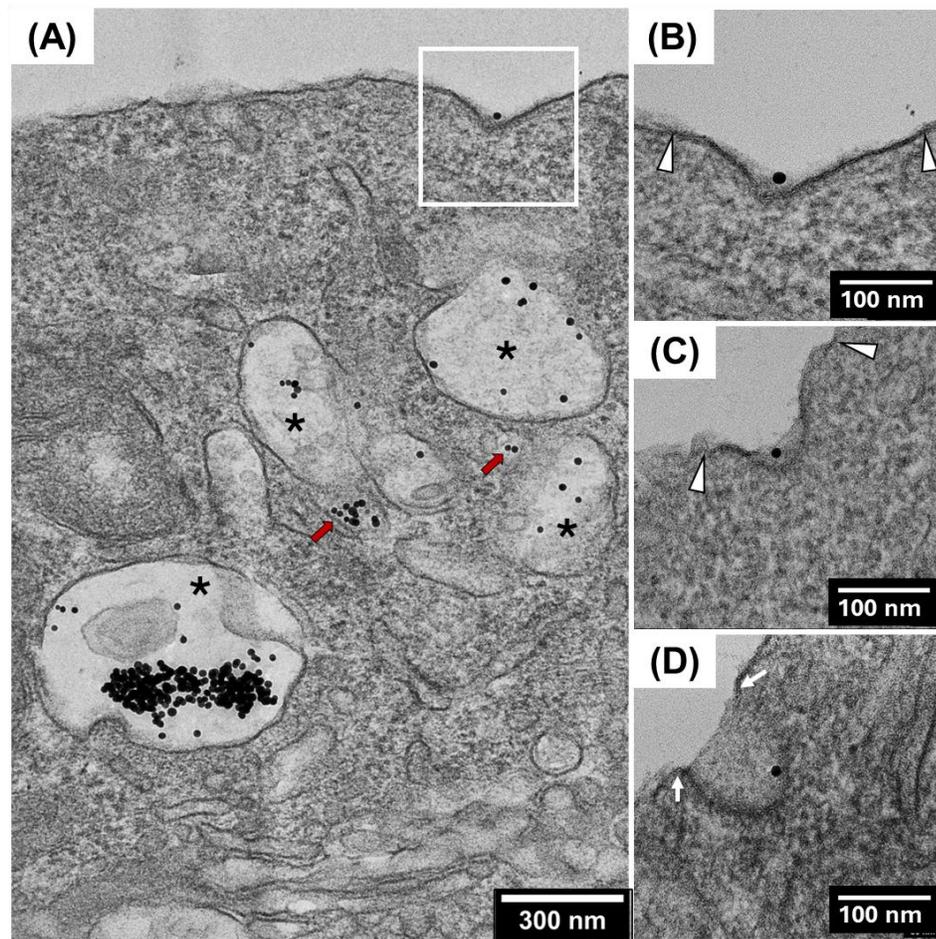
Curiosamente, el tratamiento con AuNP-mpS causó un incremento en mitocondrias y autofagosomas tras 3 h, con la localización de las AuNP en los compartimentos endosomales. Después de 6 h, las AuNP libres fueron observadas en el citoplasma, en muchas ocasiones agrupadas (Figura 17C y D). Las DCs tratadas con el conjugado AuNP-P5 mostraron cuerpos multivesiculares (MVBs) sin AuNP después de 3 h (Figura

17G). Al igual que en las muestras anteriores, se encontraron AuNP libres en el citoplasma, dentro de endosomas y asociadas con autofagosomas (Figura 17H).

Es importante resaltar que las micrografías capturaron el proceso dinámico de endocitosis, observándose la formación de fosas endocíticas, las cuales indican las etapas iniciales de la internalización de las nanopartículas (Figura 18B-D). De manera interesante, no se detectó la endocitosis de más de una AuNP por endosoma, lo que sugiere que las partículas se bioacumulan, ya que se observaron múltiples AuNP dentro de vesículas.



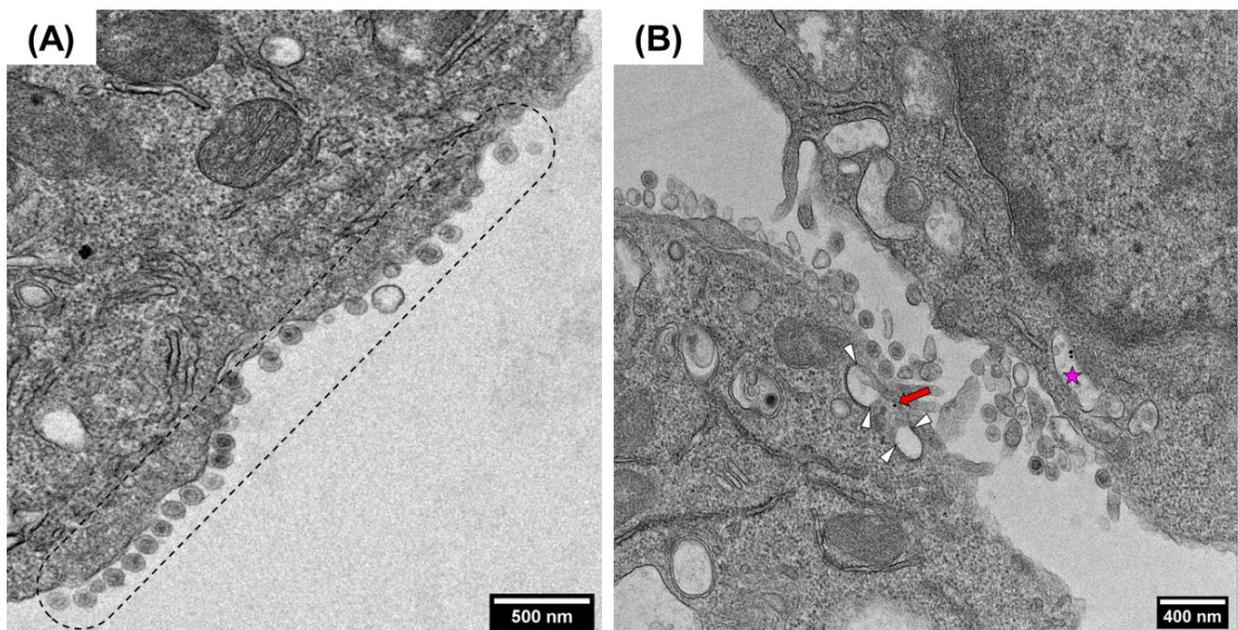
**Figura 17.** Micrografías de células DC2.4 tratadas con nanopartículas de oro (AuNP). Las células se cultivaron durante 6 h con vehículo como control (A) o con AuNP-PEG (B). También se cultivaron por 3 h (C, E, G) o 6 h (D, F, H) con los conjugados AuNP-P2, AuNP-P3 o AuNP-P5, usando 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AuNP en cada tratamiento. Se identificaron estructuras clave como mitocondrias (M), AuNP en endosomas tempranos (estrella verde) o tardíos (estrella morada), membranas de aislamiento (doble flecha), autofagosomas (punta de flecha negra), AuNP libres en el citoplasma (flecha roja) y cuerpos multivesiculares (flecha azul).



**Figura 18.** Micrografías electrónicas de células DC2.4 expuestas al conjugado AuNP-P3 durante 6 h. (A) Las AuNP se localizan dentro de compartimentos endosómicos (asterisco) y dispersas en el citoplasma (flechas rojas). (B-D) Etapas de internalización de AuNP en fosas recubiertas de clatrina, con distintos grados de invaginación. Las puntas de flecha blancas indican la extensión de las fosas, y en (D), las flechas señalan los cuellos que las conectan con el exterior celular.

En las DCs expuestas a los conjugados AuNP-P5, se observaron estructuras extracelulares con morfología esférica y una densidad electrónica similar a la de las propias DCs (Figura 19). Estas estructuras, con un diámetro promedio de  $95 \pm 8$  nm, fueron identificadas como exosomas, lo que sugiere que las células pueden haber sido activadas y que tienen la capacidad de facilitar la comunicación intercelular (Théry et al., 2018). Además, la presencia de autofagosomas y fosas recubiertas de clatrina indica la

activación de los procesos endocíticos y autofágicos. Los exosomas observados podrían desempeñar un papel relevante en la respuesta inmune, ya que es probable que estén mediando el transporte de moléculas del MHC, esenciales para la presentación de antígenos. También se observaron cuerpos multivesiculares que pueden fusionarse con los lisosomas para degradar el contenido o con la membrana plasmática para liberar vesículas al espacio extracelular. Esta doble función resalta su papel en las vías de señalización que podrían tener relación con la inducción de la respuesta inmune (Feng et al., 2020).



**Figura 19.** Inducción de zonas ricas en exosomas en células DC2.4 tras 3 h (A) y 6 h (B) de tratamiento con AuNP-P5 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las zonas con exosomas están marcadas con líneas punteadas, las fosas con clatrina con puntas de flecha blancas y las AuNP libres en el citoplasma con flechas rojas.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de plataformas vacunales innovadoras que sean seguras, estables y accesibles es un desafío urgente en el contexto de las enfermedades emergentes, como lo demostró la pandemia por SARS-CoV-2. Tradicionalmente, se ha recurrido a adyuvantes como el HA por su bajo costo y buena tolerancia; sin embargo, su limitada capacidad para inducir inmunidad duradera ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías (Shardlow et al., 2018). En este estudio, se exploró el uso de AuNP funcionalizadas y conjugadas con péptidos antigénicos del SARS-CoV-2 como una plataforma versátil para el diseño de vacunas sintéticas termoestables.

La funcionalización de las AuNP con PEG heterobifuncional permitió una configuración superficial tipo “cepillo”, optimizando tanto la estabilidad coloidal como la disponibilidad de grupos amino para la conjugación de antígenos. Esto resultó en una eficiencia de acoplamiento antigénico cercana a una monocapa por nanopartícula, lo que garantiza una buena densidad antigénica sin comprometer la estabilidad del sistema (Maurel et al., 2021; Cruje y Chithrani, 2014). Aun así, la literatura señala que la modificación superficial de AuNP, aunque necesaria para su funcionalización, puede comprometer su estabilidad coloidal, especialmente cuando se usan biomoléculas como las proteínas que poseen regiones hidrofóbicas capaces de inducir agregación (Goldstein et al., 2016; Mohammed & Al-Gawhari, 2020). Para contrarrestar estos efectos, el uso de polímeros altamente hidrofílicos como PEG ha emergido como una estrategia eficaz para lograr una estabilización estérica eficiente y conservar la monodispersión del sistema.

Se ha abordado la unión covalente de péptidos a AuNP en presencia de PEG, destacando el uso de EDC como un agente eficaz para facilitar esta conjugación. Por ejemplo, se ha reportado que la funcionalización de AuNP con PEG y su posterior tratamiento con EDC permite una alta eficiencia de acoplamiento de péptidos, lo que es crucial para aplicaciones biomédicas (Bartczak y Kanaras, 2011). Sin embargo, en cuanto al uso de GTA como agente de entrecruzamiento, la literatura es escasa en el

contexto de nanovacunas, específicamente para entrecruzar PEG con biomoléculas en AuNP, aunque su capacidad para formar enlaces covalentes estables podría ofrecer ventajas significativas en términos de durabilidad y estabilidad de los conjugados, lo cual es crucial para lograr una respuesta inmunológica robusta. En el estudio publicado por Farfán-Castro et al. (2024) se demostró que el uso de GTA como entrecruzador de péptidos y PEG fue útil en la obtención de conjugados de oro estables para su aplicación como nanovacunas. La exploración de GTA podría abrir nuevas vías para mejorar la eficacia de la conjugación y, por ende, la inmunogenicidad de los conjugados; sin embargo, es importante considerar que, a pesar de las ventajas potenciales de GTA, su uso conlleva preocupaciones sobre la biocompatibilidad y la toxicidad, ya que la formación de enlaces covalentes puede afectar la estructura del péptido o su capacidad para interactuar adecuadamente con el sistema inmunológico.

Respecto a la inmunogenicidad diferencial observada entre los péptidos funcionalizados en las AuNP, es importante considerar las características estructurales y químicas intrínsecas de cada péptido, en particular el número y la accesibilidad de aminas reactivas disponibles para la conjugación covalente. Los péptidos P1 a P5 poseen secuencias con variabilidad significativa en la cantidad de residuos lisina y otros grupos amino libres que pueden actuar como sitios para la unión mediante agentes entrecruzadores como EDC o GTA. Esta variabilidad puede afectar la densidad antigénica en la superficie de las nanopartículas, y, en consecuencia, la presentación antigénica a las células dendríticas y la posterior activación del sistema inmune.

Por ejemplo, P1 presenta dos residuos lisina, lo que facilita un número moderado de sitios de conjugación, mientras que P5 contiene varios residuos con grupos amino disponibles, aumentando su capacidad para un acoplamiento eficiente. En contraste, péptidos como P3, con menor número de aminas libres, podrían tener una eficiencia de conjugación más limitada, limitando con ello la exposición de epítopos relevantes y, en consecuencia, la respuesta inmunológica inducida. Estas diferencias se reflejaron

en los niveles séricos de IgG, donde AuNP-P5 mostró una mayor inmunogenicidad, probablemente como resultado de una mejor eficiencia de conjugación y presentación del epítipo.

Además, el grado de entrecruzamiento y la accesibilidad de las aminas también pueden modular la conformación del péptido tras la conjugación, impactando la estabilidad del complejo y su resistencia a la degradación proteolítica. Una conjugación más eficiente y estable puede prolongar la exposición del antígeno y fomentar una activación sostenida de células presentadoras de antígeno, resultando en una mayor producción de anticuerpos específicos. En este contexto, la caracterización precisa del número de aminas reactivas por péptido y la optimización del protocolo de bioconjugación representan pasos críticos en el diseño racional de estas nanovacunas.

Los ensayos de citotoxicidad mostraron que las AuNP presentan una buena biocompatibilidad en células humanas, incluso en altas concentraciones, y que la viabilidad celular se recupera con el tiempo, probablemente por mecanismos antioxidantes endógenos como el glutatión, que mitigan el estrés oxidativo transitorio inducido por las nanopartículas (Lee et al., 2019; Akhtar et al., 2012). En este estudio, se utilizaron dosis de 500  $\mu\text{g}$  de AuNP funcionalizadas con 5  $\mu\text{g}$  de péptido, proporción suficiente para alcanzar la masa de antígeno deseada. A esta concentración, las nanopartículas no mostraron efectos citotóxicos significativos, lo que sugiere que son seguras en condiciones experimentales relevantes para su uso como plataformas inmunológicas. Estos hallazgos se alinean con estudios in vivo en ratones BALB/c, donde se ha reportado que dosis de hasta 500  $\mu\text{g}$  (16–25 mg/kg en un ratón de 20–30 g) no inducen toxicidad observable, siempre que el tamaño de las partículas sea adecuado y se administre por vías como la intravenosa o subcutánea (Sonavane et al., 2008; Zhang et al., 2010). En contraste, se han observado efectos adversos significativos a dosis superiores a 8 mg/kg, incluyendo pérdida de peso, alteraciones hepáticas y daño pulmonar (Hussain et al., 2010). Estos hallazgos reafirman su potencial seguridad para aplicaciones inmunológicas, donde las dosis son bajas y

aplicadas localmente, como ocurre en la vacunación intramuscular o subcutánea (Horwitz et al., 2021).

A nivel inmunológico, los conjugados de AuNP mostraron una alta inmunogenicidad, induciendo títulos de IgG, significativamente superiores a los generados por el adyuvante HA y con una marcada polarización hacia IgG1, característica de una respuesta Th2. Este perfil se asocia con la secreción de citocinas IL-4 e IL-6 por DCs, lo cual potencia la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos (Aljabali et al., 2023; Sengupta et al., 2022b). Adicionalmente, la supresión de TNF- $\alpha$  observada sugiere un efecto inmunomodulador que podría ser útil para prevenir respuestas inflamatorias exacerbadas, como las tormentas de citocinas.

El análisis ultraestructural mediante TEM reveló que las AuNP son eficientemente internalizadas por DCs a través de endocitosis mediada por clatrina, acumulándose en endosomas y lisosomas. No se observaron alteraciones estructurales significativas ni signos de citotoxicidad, lo que coincide con estudios previos y refuerza su perfil de seguridad (Aili et al., 2023; Alobaid et al., 2024). Asimismo, la presencia de cuerpos multivesiculares, exosomas y autofagosomas sugiere una activación del sistema de procesamiento antigénico y una posible participación en la comunicación intercelular, procesos clave en la inducción de una respuesta inmune adaptativa (Macagno et al., 2007; Panzarini et al., 2018).

A pesar de estos resultados alentadores, la literatura destaca desafíos importantes para el futuro desarrollo de nanovacunas basadas en AuNP. Aunque se han identificado candidatos prometedores, los ensayos clínicos en curso son limitados, lo que evidencia la necesidad de ampliar las evaluaciones preclínicas bajo condiciones de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y eventualmente escalar su producción bajo normas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMPc). Este proceso requiere alianzas estratégicas entre instituciones académicas y la industria farmacéutica, para superar

las barreras técnicas y regulatorias asociadas a este tipo de productos (Goldstein et al., 2016).

Una prioridad será también la investigación sobre el destino y la persistencia de las AuNP en mamíferos. Aunque en inmunización las dosis empleadas son significativamente menores que en aplicaciones de administración sistémica como la entrega de fármacos, los estudios a largo plazo sobre bioacumulación y toxicidad siguen siendo necesarios para garantizar su seguridad (Sabourian et al., 2020; Shang et al., 2014).

Otra área crítica por fortalecer es la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la inmunoestimulación por AuNP. El uso de herramientas como la transcriptómica en APC podría proporcionar una visión global sobre las vías de señalización moduladas por estas nanopartículas. Estudios previos han indicado que las AuNP activan la vía Keap1/Nrf2 en macrófagos y promueven una fuerte señalización de NF- $\kappa$ B en DCs, lo que puede favorecer su maduración y evitar fenómenos de tolerancia inmunológica (Horwitz et al., 2021; Goldstein et al., 2016). La inclusión de adyuvantes accesorios, así como la optimización de la forma, tamaño y ruta de administración de las AuNP serán elementos clave para mejorar el diseño de vacunas más eficaces y específicas.

Desde un punto de vista técnico, es fundamental estandarizar y documentar detalladamente los protocolos de funcionalización y estabilización de las AuNP, aspectos que frecuentemente se omiten o se describen de manera superficial en la literatura. Además, se requiere el desarrollo de procesos reproducibles de concentración, esterilización y escalado de la producción. Por ejemplo, se ha estimado que para obtener una dosis inmunogénica adecuada ( $\sim 10 \mu\text{g}$  de péptido) a partir de AuNP de 15 nm, serían necesarios hasta 4 mL de suspensión coloidal, lo cual representa un reto técnico en términos de formulación y almacenamiento si no se aplican pasos de concentración (Farfán-Castro et al., 2021).

Una de las ventajas más prometedoras de las AuNP es su estabilidad térmica. Se ha demostrado que vacunas liofilizadas basadas en AuNP pueden mantener su actividad inmunogénica durante meses incluso bajo temperaturas elevadas (37-50 °C), como se evidenció en el estudio de Ingrole et al. (2021) con una vacuna contra influenza A. Esta capacidad de soportar condiciones ambientales adversas representa una ventaja significativa frente a las vacunas convencionales, que dependen estrictamente de la cadena de frío para mantener su estabilidad y eficacia. Además, se ha reportado que los recubrimientos con moléculas altamente hidrofílicas, como el PEG, permiten una mayor tolerancia a la salinidad y a la variación térmica, gracias a la estabilización estérica que imparten (Mohammed & Al-Gawhari, 2020). Esto hace de las AuNP una plataforma vacunal ideal para contextos de bajos recursos o regiones con infraestructura limitada, donde el almacenamiento y distribución a temperaturas controladas representa un desafío logístico y económico considerable.

Desde el punto de vista económico, las vacunas basadas en AuNP también ofrecen ventajas. Se estima que una dosis funcionalizada con 100 µg de un péptido de aproximadamente 4 kDa puede producirse a un costo aproximado de 1.6 USD (Farfán-Castro et al., 2021), lo cual es competitivo en comparación con otras plataformas vacunales. Aun considerando esquemas de inmunización que incluyan múltiples dosis, el costo total seguiría siendo bajo, facilitando su adopción a gran escala en campañas de vacunación masiva.

Otro aspecto relevante que se destacó en este trabajo fue la ausencia de alteraciones estructurales en los tejidos de ratón tratados con AuNP. La localización preferencial de las AuNP en lisosomas, sin evidencia de daño en organelos como mitocondrias o núcleos, sugiere que las células son capaces de manejar la presencia de AuNP sin generar citotoxicidad aparente en el corto plazo. Este hallazgo refuerza el perfil de biocompatibilidad observado *in vitro*, aunque estudios a más largo plazo serán indispensables para confirmar la ausencia de efectos acumulativos o retardados,

especialmente en tejidos con capacidad limitada de renovación (Sabourian et al., 2020).

La proximidad observada entre las AuNP y las fibras de colágeno en el sitio de inyección sugiere posibles interacciones con la matriz extracelular (ECM), lo cual podría tener implicaciones tanto en la modulación de respuestas inflamatorias locales como en la remodelación tisular. El tamaño de las fibras de colágeno y su organización en la matriz actúan como una malla tridimensional que puede retener mecánicamente nanopartículas en un rango de 10-100 nm, lo que explicaría en parte esta acumulación localizada (Cassani et al., 2025). Estas interacciones podrían influir en la biodisponibilidad del antígeno y en la respuesta inmunológica generada. La caracterización de estas dinámicas requerirá estudios específicos utilizando técnicas avanzadas de imagen y análisis bioquímicos centrados en la ECM.

Finalmente, la discusión en la literatura sobre los mecanismos celulares encargados de la eliminación de nanopartículas, como la exocitosis y la apoptosis, indica que el tamaño, la forma y las propiedades de superficie de las AuNP son determinantes en su procesamiento intracelular (Shang et al., 2014). La comprensión detallada de estos procesos es clave para evitar la sobrecarga celular y asegurar una respuesta inmunológica efectiva sin efectos adversos.

En conjunto, los hallazgos de este estudio y la información recopilada de la literatura especializada permiten vislumbrar un futuro prometedor para las AuNP como plataformas vacunales. No obstante, el camino hacia su implementación clínica requiere superar importantes desafíos regulatorios y científicos. La implementación de la producción bajo estándares GMPc, y la realización de estudios preclínicos robustos bajo GLP son pasos necesarios para consolidar esta tecnología. Asimismo, la aplicación de herramientas ómicas como la transcriptómica y la proteómica permitirá una caracterización más exhaustiva de las respuestas celulares inducidas por las AuNP, optimizando así su diseño racional como nanoadyuvantes e inmunógenos.

En conclusión, el presente estudio proporciona evidencia clara y sólida de que las AuNP, en especial aquellas funcionalizadas con péptidos como AuNP-mpS y AuNP-P5, son capaces de inducir una respuesta inmunológica de tipo Th2 robusta, lo que las posiciona como candidatas viables y seguras para el desarrollo de nanovacunas. A través de un enfoque experimental riguroso, se demostró su internalización eficiente en DCs, su procesamiento intracelular mediante vías endocíticas bien caracterizadas, y su capacidad para modular la secreción de citocinas clave sin inducir toxicidad evidente, ni en células inmunes ni en tejidos animales.

Estos hallazgos no sólo consolidan el potencial inmunoestimulante de las AuNP como adyuvantes, sino que además sientan bases fundamentales para su aplicación en inmunoterapia y vacunación preventiva. Asimismo, destacan la necesidad de abordar retos críticos para su implementación clínica, como la estabilización coloidal tras la funcionalización, la validación toxicológica a largo plazo y la optimización de procesos escalables bajo normas GMPc.

Por tanto, este trabajo no sólo aporta conocimiento mecanístico sobre la interacción de las AuNP con el sistema inmune, sino que también representa un avance estratégico hacia la consolidación de plataformas vacunales más accesibles, estables y eficaces. En este sistema, las AuNP actúan como vehículos y posibles coadyuvantes que facilitan la entrega y presentación del péptido antigénico, siendo este último el principal responsable de inducir la respuesta inmune específica. La relevancia de este trabajo es doble: científica, por ampliar la comprensión sobre nanomateriales inmunomoduladores, y aplicada, por contribuir al desarrollo de nuevas generaciones de vacunas más económicas, estables fuera de cadena de frío y adaptables a contextos globales.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que las AuNP funcionalizadas con péptidos antigénicos derivados de la proteína S del SARS-CoV-2 constituyen una plataforma promisorio para el diseño de nanovacunas. La caracterización fisicoquímica detallada de los bioconjugados (mediante UV-Vis, DLS, FTIR y TGA) confirmó una funcionalización estable y reproducible, con propiedades morfológicas y de carga compatibles con una formulación segura y eficiente. La inclusión de PEG como agente de funcionalización superficial contribuye adicionalmente a la estabilidad coloidal y a la reducción de interacciones inespecíficas, favoreciendo la biodisponibilidad.

La captación eficiente de las AuNP por DCs, observada mediante TEM y corroborada por la expresión de marcadores de maduración, evidencia una interacción intracelular activa que favorece el procesamiento y presentación antigénicos. Esto sugiere que las AuNP no solo actúan como vehículos, sino que también participan activamente en la modulación de la respuesta inmune adaptativa.

La reducción significativa de la expresión de TNF- $\alpha$  en cultivos de DCs tratados con AuNP indica un efecto inmunomodulador adicional, posiblemente relacionado con la interferencia en rutas de señalización inflamatoria. Esta propiedad abre nuevas posibilidades terapéuticas más allá del campo preventivo, al posicionar a las AuNP como potenciales agentes con actividad dual.

La evaluación toxicológica in vivo, basada en análisis histológicos de órganos clave como hígado, riñón y piel, no evidenció alteraciones estructurales atribuibles a la administración de las AuNP, lo que respalda su biocompatibilidad a mediano plazo y refuerza su potencial para aplicaciones repetidas o prolongadas. No obstante, la presencia de infiltrados inflamatorios focalizados en tejido hepático sugiere una actividad inmunológica localizada que merece atención, dado que podría reflejar una

respuesta inmunitaria tisular incipiente o una biodistribución no completamente controlada.

Desde el punto de vista inmunológico, los títulos de anticuerpos inducidos por los bioconjugados AuNP-péptido fueron comparables o superiores a los obtenidos con el adyuvante convencional (hidróxido de aluminio), destacando no solo la eficacia de esta plataforma, sino también su capacidad para modular la respuesta de IgG hacia subclases funcionalmente relevantes en la neutralización viral. En particular, se observó un predominio de la subclase IgG1, indicativa de una respuesta de tipo Th2, la cual se asocia con una inmunidad humoral robusta, característica de vacunas basadas en subunidades.

A pesar de que todos los péptidos utilizados fueron capaces de inducir una respuesta inmune humoral, se observaron diferencias en los títulos de IgG obtenidos entre ellos, lo cual puede atribuirse tanto a sus características estructurales como a su número de grupos amino disponibles para la conjugación covalente con la superficie de las AuNP (**Tabla A 3** del Anexo). Por ejemplo, péptidos como P2 y P5, que contienen múltiples residuos de lisina y arginina, presentan una mayor cantidad de aminas primarias libres, lo que podría favorecer una orientación más efectiva en la superficie del bioconjugado, mejorando la exposición de epítomos inmunológicamente relevantes. Esta diferencia en la eficiencia de presentación antigénica explicaría, al menos en parte, su superior desempeño inmunogénico en comparación con otros péptidos de menor carga positiva o estructura más compacta. En consecuencia, el diseño racional de nanovacunas basadas en péptidos deberá considerar no sólo la afinidad antigénica de la secuencia, sino también su compatibilidad química para la bioconjugación, buscando optimizar tanto la densidad como la orientación del antígeno sobre la nanopartícula.

La heterogeneidad observada en la eficiencia de internalización y procesamiento intracelular entre distintos conjugados sugiere que la secuencia específica del péptido antigénico tiene un impacto determinante en la interacción célula-nanopartícula, lo que

implica la necesidad de optimizar individualmente cada formulación para maximizar su eficacia inmunológica.

Sin embargo, persisten desafíos importantes, entre ellos la necesidad de profundizar en la evaluación de la inmunidad celular, en particular la activación de linfocitos T citotóxicos y células T de memoria, elementos esenciales para establecer una protección duradera frente a infecciones virales.

Finalmente, este estudio resalta la importancia de considerar las propiedades fisicoquímicas integradas (como diámetro hidrodinámico, potencial  $\zeta$  y densidad de injerto) como parámetros críticos de diseño que influyen de manera directa en el comportamiento biológico de los conjugados, reforzando la necesidad de un enfoque multidisciplinario en el desarrollo racional de vacunas basadas en nanomateriales.

En conjunto, este trabajo aporta evidencia preclínica robusta que posiciona a las AuNP como una plataforma tecnológicamente prometedora para el desarrollo de vacunas de subunidades racionalmente diseñadas. Su eventual transición hacia aplicaciones clínicas requerirá estudios adicionales que profundicen en la caracterización de la inmunogenicidad celular, la biodistribución tisular a largo plazo y sus efectos protectores en modelos de desafío viral.

## ANEXO DE TABLAS

**Tabla A 1.** Identificación de bandas FTIR.

| Banda | Longitud de onda<br>(cm <sup>-1</sup> ) | Grupo funcional  |
|-------|---|--|
| 1     | 3000-3657                               | O–H estiramiento   |
| 2     | 2956                                    | C–H sp <sup>3</sup> estiramiento asimétrico (CH <sub>3</sub> )       |
| 3     | 2912                                    | C–H sp <sup>3</sup> estiramiento asimétrico (CH <sub>2</sub> )       |
| 4     | 2845                                    | C–H sp <sup>3</sup> estiramiento simétrico (CH <sub>2</sub> )        |
| 5     | 1725                                    | C=O estiramiento (carboxílico)                                       |
| 6     | 1622                                    | C=O estiramiento (amida I)   |
| 7     | 1576                                    | N–H flexión (amina I)  |
| 8     | 1543                                    | N–H flexión (amida II)   |
| 9     | 1465                                    | C–H flexión (–CH <sub>2</sub> – grupo metileno)                      |
| 10    | 1415                                    | COO <sup>-</sup> estiramiento simétrico (carboxilato en aminoácidos) |
| 11    | 1333                                    | O–H flexión (fenol)  |
| 12    | 1257                                    | C–N estiramiento (amina I)   |
| 13    | 1140                                    | O–H flexión (ácido carboxílico)                                      |
| 14    | 1084                                    | C–O estiramiento (éter)  |
| 15    | 1020                                    | C–O estiramiento (éter)  |
| 16    | 860                                     | C–H flexión (1,4-disustituído)                                       |
| 17    | 794                                     | S–C estiramiento   |
| 18    | 720                                     | C–H vibración oscilante (CH <sub>2</sub> cadena larga)               |

**Tabla A 2.** Datos de pérdida de masa por TGA de AuNP estabilizadas con citrato, funcionalizadas con PEG o conjugadas.

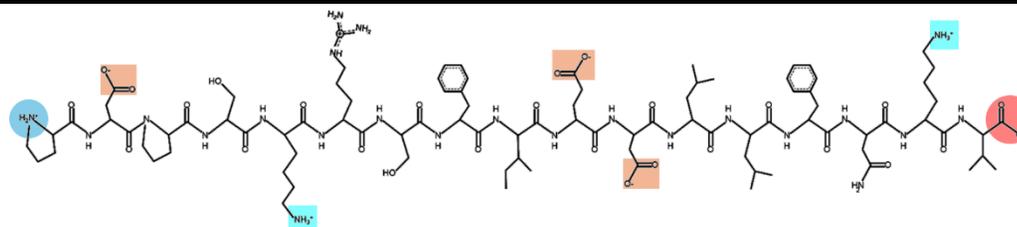
| Muestra |      | Onset 1 |     | Onset 2 |     | Peso a 600 °C (%) | Pérdida de peso (%) |      |         |       | Pérdida de peso (mg) |      |         |       |
|---------|------|---------|-----|---------|-----|-------------------|---------------------|------|---------|-------|----------------------|------|---------|-------|
| ID      | mg   | %       | °C  | %       | °C  |                   | Péptido             | PEG  | Citrato | Total | Péptido              | PEG  | Citrato | Total |
| AuNP    | 2.36 | 99.78   | 200 | -       | -   | 98.79             | -                   | -    | 0.99    | 0.99  | -                    | -    | 0.02    | 0.02  |
| PEG     | 2.60 | 97.28   | 200 | 96.63   | 320 | 88.33             | -                   | 8.3  | -       | 8.95  | -                    | 0.22 | -       | 0.23  |
| P1      | 2.34 | 98.73   | 200 | 93.07   | 342 | 87.08             | 5.66                | 5.99 | -       | 11.65 | 0.13                 | 0.14 | -       | 0.27  |
| P2      | 3.99 | 95.48   | 215 | 91.47   | 346 | 83.06             | 4.01                | 8.41 | -       | 12.42 | 0.16                 | 0.34 | -       | 0.50  |
| P3      | 3.17 | 95.94   | 212 | 91.42   | 344 | 83.6              | 4.52                | 7.82 | -       | 12.34 | 0.14                 | 0.25 | -       | 0.39  |
| P4      | 2.13 | 96.98   | 200 | 89.87   | 344 | 83.42             | 7.11                | 6.45 | -       | 13.56 | 0.15                 | 0.14 | -       | 0.29  |
| P5      | 2.93 | 97.36   | 213 | 92.35   | 356 | 85.13             | 5.01                | 7.22 | -       | 12.23 | 0.15                 | 0.21 | -       | 0.36  |

**Tabla A 3.** Características estructurales de los péptidos antigénicos utilizados, número de aminas reactivas y su posible influencia en la eficiencia de conjugación.

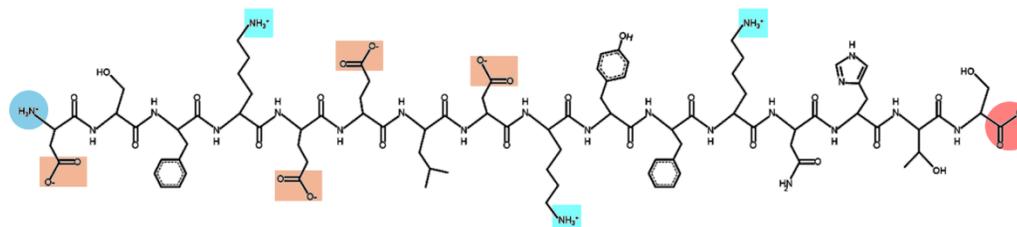
| Péptido | Estructura  |  |
|---------|---|--|
| P1      | <p><b>Secuencia:</b><br/>TESNKKFLPFQQFGRDIA</p> <p><b>Aminas reactivas:</b><br/>3 (N-ter + 2 K)</p> |  |
| P2      | <p><b>Secuencia:</b><br/>HADQLTPTWRVYSTGSNV</p> <p><b>Aminas reactivas:</b><br/>1 (N-ter)</p>       |  |
| P3      | <p><b>Secuencia:</b><br/>SYQTQTNSPRRA</p> <p><b>Aminas reactivas:</b><br/>1 (N-ter)</p>             |  |

Tabla A 3. Continuación.

**P4**  
**Secuencia:**  
PDPSKRRSFIEDLLFNKV  
**Aminas reactivas:**  
3 (N-ter + 2 K)



**P5**  
**Secuencia:**  
DSFKEELDKYFKNHTS  
**Aminas reactivas:**  
4 (N-ter + 3K)



- N-ter (círculo azul): grupo amino libre en el extremo N-terminal del péptido.
- K (recuadro azul): residuos de lisina con grupo  $\epsilon$ -amino libre, potencialmente conjugables.
- D/E (recuadro rojo): residuos de ácido aspártico (D) y glutámico (E), con carga negativa a pH fisiológico, que podrían generar repulsión electrostática con superficies funcionalizadas negativamente.
- El número y posición de grupos amino puede influir en la eficiencia de acoplamiento covalente a AuNP, la orientación del péptido en la superficie y la densidad antigénica efectiva.

## ARTÍCULO PUBLICADO



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Jose Mauro Granjeiro,  
National Institute of Metrology, Quality and  
Technology, Brazil

## REVIEWED BY

Iram Maqsood,  
University of Maryland, United States  
Vadanasundari Vedarethinam,  
Cornell University, United States

## \*CORRESPONDENCE

Mariano J. García-Soto,  
✉ mariano.soto@uaslp.mx  
Omar González-Ortega,  
✉ omar.gonzalez@uaslp.mx  
Sergio Rosales-Mendoza,  
✉ rosales.s@uaslp.mx

RECEIVED 08 November 2023

ACCEPTED 03 January 2024

PUBLISHED 02 February 2024

## CITATION

Farfán-Castro S, García-Soto MJ,  
Betancourt-Mendiola L, Cervantes J, Segura R,  
González-Ortega O and Rosales-Mendoza S  
(2024), Synthesis and evaluation of gold  
nanoparticles conjugated with five antigenic  
peptides derived from the spike protein of  
SARS-CoV-2 for vaccine development.  
*Front. Nanotechnol.* 6:1335346.  
doi: 10.3389/fnano.2024.1335346

## COPYRIGHT

© 2024 Farfán-Castro, García-Soto,  
Betancourt-Mendiola, Cervantes, Segura,  
González-Ortega and Rosales-Mendoza. This is  
an open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is permitted,  
provided the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic practice.  
No use, distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with these  
terms.

# Synthesis and evaluation of gold nanoparticles conjugated with five antigenic peptides derived from the spike protein of SARS-CoV-2 for vaccine development

Susan Farfán-Castro<sup>1</sup>, Mariano J. García-Soto<sup>2\*</sup>,  
Lourdes Betancourt-Mendiola<sup>1,2</sup>, Jacquelynne Cervantes<sup>3</sup>,  
René Segura<sup>3</sup>, Omar González-Ortega<sup>1,2\*</sup> and  
Sergio Rosales-Mendoza<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico, <sup>3</sup>Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

**Introduction:** The development of innovative anti-COVID-19 vaccines is a need to ensure the population's immunity worldwide, with broad protection against variants of concern and low cost as the main goals. Gold nanocarriers are potential entities that could aid in the development of innovative vaccines having thermal stability, high immunogenicity, and safety as the main attributes. Moreover, this approach could lead to adjuvant-free formulations, which will reduce the costs of vaccines.

**Methods:** In this study, five peptides (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, and P<sub>5</sub>) corresponding to linear epitopes of the SARS-CoV-2 spike (S) protein were chemisorbed on gold nanoparticles (AuNP) of 20 nm, prefunctionalized with heterobifunctional polyethylene glycol, by using glutaraldehyde as crosslinker to generate nanovaccine prototypes.

**Results and discussion:** The surface modification was confirmed by DLS with an increase of  $31.7 \pm 1.8$  nm in the hydrodynamic diameter and an average  $\zeta$  potential of  $-8.3 \pm 2.2$  mV in PBS (as excipient). The coupling concentration achieved was  $23.7 \pm 7.1$   $\mu$ g of peptide per mg AuNP. These AuNP-based conjugates showed no inherent toxicity in assays performed with HEK293T cells, in which a 100–1,000  $\mu$ g/mL concentration range only led to a temporary decrease of up to 30% in cell viability after 48 h of treatment with restoration by 72 h. The immunogenicity of the conjugates produced was assessed in test mice subjected to three subcutaneous doses at 2-week intervals. Significant levels of IgM against each target peptide were observed at an early stage of the immunization scheme in all groups, reaching maximum levels after the second dose, whereas the IgG response increased after the third dose. The AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> conjugates induced the highest levels of IgG antibodies, lasting for at least 2 months after the last boost, with a predominance of the IgG1 subclass. Although the magnitude of the response induced by the gold conjugates was

comparable to that with alum as adjuvant, these nanoconjugates induced a longer response. Our data support the use of AuNP as carriers in innovative vaccines against SARS-CoV-2.

#### KEYWORDS

humoral response, nanovaccine, adjuvant, COVID-19, antigen carrier

## 1 Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, currently recognized as ongoing health issue, has infected almost 676.6 million people worldwide and caused the death of 6.9 million people as of October 2023 (World Health Organization, 2023). The causal agent, SARS-CoV-2, belongs to the family *Betacoronaviridae*, from which other pathogenic strains such as the severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 (SARS-CoV-1) and the Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV) caused epidemic outbreaks in 2003 and 2012, respectively (Krishnamoorthy et al., 2020).

The epidemiologic impact of SARS-CoV-2 (Ghafari et al., 2022) led to the accelerated development of vaccines, achieving in a record time the approval for emergency use of several vaccines based on different platforms. These vaccines include mRNA (Moderna and Pfizer-BioNTech), non-replicating viral vectors (Oxford-AstraZeneca), inactivated viruses (Sinovac and Bharat Biotech), and recombinant proteins (Novavax and Sanofi-GSK) as immunogens (Callaway, 2020; Chung et al., 2021).

Since the first reports of SARS-CoV-2 infections in humans, numerous genetically distinct lineages have evolved (CoVariants, 2020). Recently, the emergence of several variants of concern (VOC) bearing mutations with phenotypic implications is of critical interest for the field since VOC exhibit increased transmissibility, enhanced disease severity, or the capability to escape from neutralizing antibodies, which impose the need for modifying the handling strategies of the disease. Its increased transmissibility is of particular concern, as it increases the infection rates and may require more stringent public health measures. Variants escaping from neutralizing antibodies induced by the vaccines originally used require the development of new vaccines updated with the new antigenic sequences (McLean et al., 2022). Moreover, the current vaccines have a low efficacy in terms of protecting against the infection onset and its transmission among individuals. In this context, the development of new vaccines based on rationally designed antigens and mucosal administration (i.e., oral or intranasal routes) is a potential approach to overcome the low protection against infection, transmission, and escape by new variants (Dai and Gao, 2021; European Medicines Agency, 2021; U.S. Food and Drug Administration, 2021).

The typical target in the current COVID-19 vaccines is the spike (S) protein, which is a potent immunogen even in its soluble form, inducing protective cellular and humoral immune responses (Kang et al., 2021). An alternative is the use of synthetic peptides representing epitopes from the S protein, which allows focusing the immune response on the antigenic determinants that mediate protection. However, since peptides are poorly immunogenic, the use of a carrier/adjuvant is crucial. Nanoparticles may act as protective carriers that prolong the half-life of the antigen, exert

immunostimulatory activities, and ultimately enhance the immune response. Gold nanoparticles (AuNP) are an advantageous material to use in nanovaccines due to their biocompatibility (Shukla et al., 2005), tunability in terms of surface modification with biomolecules (Bartczak and Kanaras, 2011; Perry et al., 2012; Rahme et al., 2013; Vasquez et al., 2014; Wang et al., 2013), convenient size, and synthesis approach (Mironava et al., 2010; Niikura et al., 2013; Favi et al., 2015). These characteristics offer the potential to favor the development of safe and highly immunogenic vaccines. The feasibility of AuNP-based vaccine prototypes has been assessed with promising results in terms of the induction of humoral and T cell responses (Dykman et al., 2018; Li Y. et al., 2020; Y; Liu et al., 2021; Wang et al., 2017; Zhang, 2015; Zhou et al., 2016). Some studies have reported the induction of Th1 (Climent et al., 2018; Shinchi et al., 2019), Th2, and Th17 responses (Tapia et al., 2021; Trabbic et al., 2021) which indicate that these carriers are versatile entities for the design of a diverse group of vaccines. AuNP have also been shown to be efficiently internalized by dendritic cells leading to their activation, which explain their adjuvant effects (Raghuwanshi et al., 2012; Tomić et al., 2014; Gulla et al., 2019; Meka et al., 2019).

Until now, most of the subunit COVID-19 vaccines are based on the full-length S protein or its receptor-binding domain (RBD) as target antigens. However, exploring epitope-based vaccines formulated with specific peptides is an alternative for the generation of universal vaccines based not necessarily on the RBD, but in linear, conserved epitopes with neutralizing potential (Ng et al., 2022). In this study, five peptides derived from the S protein, spatially distributed in the S1 and S2 subunits (Figure 1) were individually conjugated to AuNP. The methods for the efficient generation of the AuNP conjugates, their physicochemical characterization, and immunogenicity assessment in test mice are reported. Overall, the nanovaccines proposed have the ability of inducing humoral responses against the SARS-CoV-2 spike protein.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Selection of peptide antigens

Five linear epitopes from the S protein were selected based on a bibliographic search of epitopes with demonstrated antigenicity and potential to generate neutralizing antibodies (Amrun et al., 2020; Heffron et al., 2020; Li L. et al., 2020; Poh et al., 2020; Pinto et al., 2021). These epitopes correspond to antigenic regions derived from the S protein of SARS-CoV-2. The peptide sequences and their position in the S protein are: P<sub>1</sub> (553-*TESNKKFLPFQQFGRDIA*-570), P<sub>2</sub> (625-*HADQLTPTWRVYSTGSNV*-642), P<sub>3</sub> (673-*SYQTQTNPRRA*-684), P<sub>4</sub> (810-*PDPSKRSFIEDLLFNKV*-826), and P<sub>5</sub> (1146-*DSFKEELDKYFKNHTS*-1161). The corresponding peptides were synthesized by GenScript Biotech (Piscataway, NJ).

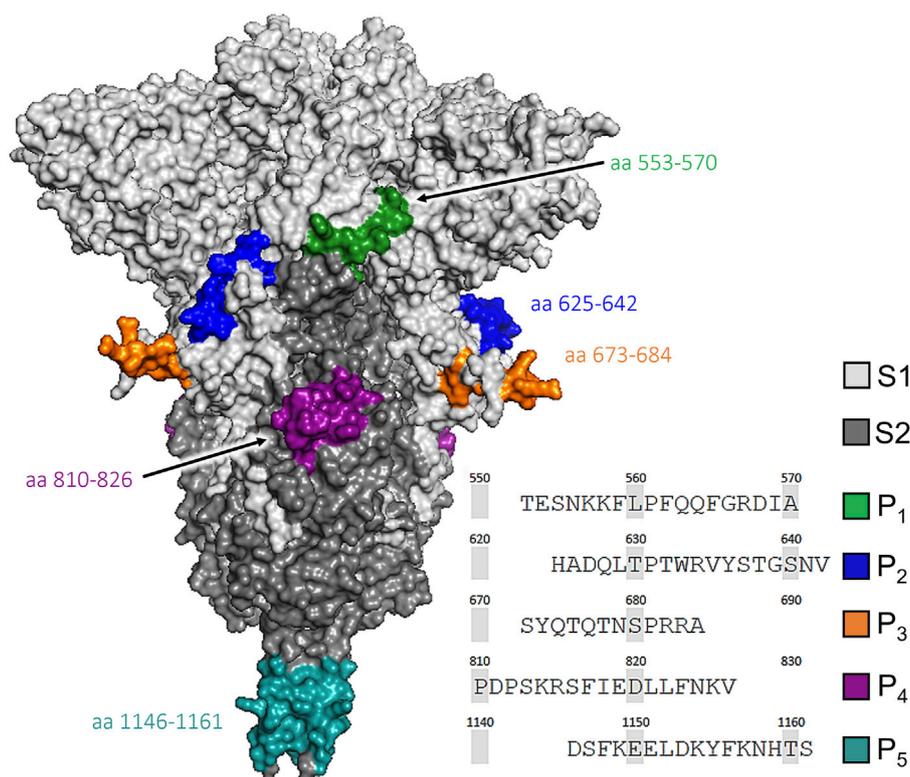


FIGURE 1

Molecular structure of the SARS-CoV-2 spike (S) protein showing its S1 (light grey) and S2 (dark grey) subunits. The locations of the selected peptide sequences are marked as: P<sub>1</sub> (553–570, green), P<sub>2</sub> (625–642, blue), P<sub>3</sub> (673–684, orange), P<sub>4</sub> (810–826, purple), and P<sub>5</sub> (1,146–1,161, teal). The 3D visualization was obtained from NCBI (PDB ID: 6XR8) and rendered with PyMOL 2.5.4 (Schrödinger Inc., New York, NY).

## 2.2 Synthesis and conjugation of AuNP

The synthesis of AuNP (5× stock) and the conjugation reactions we performed following previously reported methods (Farfán-Castro et al., 2021). 5% stock solutions of HAuCl<sub>4</sub> and sodium citrate were prepared 24 h before using them to ensure their complete speciation. For the synthesis, a reaction mixture containing 1% of each precursor was prepared and stored away from light 5 min. This mixture was added rapidly to a flask with boiling water to obtain a 0.05% final concentration and kept under reflux 30 min. The solutions were prepared with milli-Q water and the flask was washed with aqua regia prior to its use.

For the functionalization, per each mL of AuNP the following reagents were added in this order: 5 μL of 1 M HCl, HS-PEG5k-NH<sub>2</sub> (equivalent to five monolayers of PEG per AuNP, considering a grafting density of 2 PEG/nm<sup>2</sup>), and 2 μL of 5% Tween 20. This solution was mixed overnight at 4 rpm. The functionalized AuNP were washed twice with 1× PBST (1× PBS with 0.01% Tween 20) with centrifugation steps in between (10 min at 20,000 × g). The derivative AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> was divided into five equal parts to perform individual conjugation reactions with the target peptides. 100× glutaraldehyde (GTA) was added as amine-reactive crosslinker, reacted 1 h under constant mixing at 4 rpm, and subsequently washed with PBST. Finally, the amount required of the target peptide to form four monolayers per particle was added, reacted overnight under the same conditions, washed before adding

20× NaBH<sub>4</sub>, reacted for 1 h, and finally washed. Each conjugate was concentrated 20× to a final volume of 1.5 mL. Major reactants, sequence and reaction steps are described in Supplementary Table S1. The synthesis of AuNP, their functionalization with PEG, and their conjugation with peptides was performed in three separate occasions, characterizing their properties and quantifying unbound peptides to validate their monodispersity and dosage (μg peptide per mg AuNP) prior their use in viability and immunogenicity assays.

## 2.3 Characterization of AuNP and conjugates

The size and morphology of AuNP were analyzed using a transmission electron microscope JEM-2001 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operated at 200 kV. Of a 1:200 dilution of the AuNP synthesized, 5 μL were deposited on a nickel formvar/carbon-coated grid, allowing it to dry 10 min before storing it in a desiccator for 24 h. From the collected TEM images the size distribution of 700 particles was obtained after calculating shape parameters with ImageJ 1.53e (NIH, Bethesda, MD).

The AuNP were characterized before and after their functionalization and conjugation using a UV-vis spectrophotometer Genesys 50 (Thermo-Fisher, Waltham, MA). Changes in the hydrodynamic diameter (d<sub>H</sub>), polydispersity index (PDI), and ζ potential were determined with a Zetasizer Pro

(Malvern Ltd., Malvern, United Kingdom). To compare with the as-prepared AuNP, the functionalized and conjugated AuNP were adjusted to 1.0 of absorbance with 0.1× PBS. A capillary cell DTS1070 (Malvern) was used to measure the  $\zeta$  potential at 25°C with a RI of 0.18 and absorption of 3.343 for gold (Johnson and Christy, 1972).

FTIR analysis was performed to evidence the functional groups associated with the presence of the peptide coupled onto the AuNP surface. For each sample, an aliquot containing 1 mg of gold was concentrated to a volume of 50  $\mu$ L, deposited on a non-stick silicone surface, and placed in a desiccator for 24 h. The dry sample was carefully transferred with a fine spatula and the spectra were recorded in the 4,000–400  $\text{cm}^{-1}$  region with a total of 254 scans, using an IR spectrometer Nicolet iS10 (Thermo-Fisher) with the Smart iTX ATR sampling accessory.

TGA measurements were performed using a thermogravimetric analyzer TGA-550 (TA Instruments, New Castle, DE). Samples of citrate-capped, functionalized, or conjugated AuNP were dried in the same manner as for the FTIR analysis, concentrating an aliquot containing 3 mg of gold in 50  $\mu$ L. The heating rate was set to 10°C/min with a temperature range of 30–600°C. Pure samples of sodium citrate and HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> were analyzed to identify the signals corresponding to the nanoparticle stabilizer (Supplementary Figures S2–S5).

## 2.4 Analysis of remanent peptides by HPLC

The unbound peptide was quantified from the reaction supernatants by HPLC using an Agilent 1200 Series Gradient (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The separation was carried out on a C18 reversed-phase column with a linear gradient (solution A: 0.1% C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub> in water, solution B: 0.1% C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub> in CH<sub>3</sub>CN) at a flow rate of 0.6 mL/min for 10 min. The injection volume was 50  $\mu$ L at an injection rate of 0.2 mL/min. The detection wavelength was set to 214 nm. Calibration lines for each peptide were prepared with standard solutions in a range of 25–200  $\mu$ g/mL (Supplementary Figure S1). Each standard and sample were centrifuged 2 min at 21,000 × g and the upper phase was recovered and transferred to a vial for HPLC analysis. Unreacted peptide controls were used for each determination at the same initial concentration used for conjugation.

## 2.5 Resazurin cell viability assay

The cytotoxicity of the conjugates was evaluated in HEK-293T cells (ATCC CRL-3216, USA) using the resazurin reduction assay. Cells were cultured in DMEM (supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>) using T75 flasks until reaching 80% confluency. One day before the cytotoxicity evaluation and after over 10 passages, 1×10<sup>4</sup> cells were seeded by triplicate in a 96-well culture plate. Control cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 mM) or the vehicle alone (RPMI medium). Cells were exposed to different concentrations (0.1–1,000  $\mu$ g/mL) of functionalized gold nanoparticles (AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>) or a mixture of the five conjugates (AuNP-mpS) for 24, 48, and 72 h under the culture conditions mentioned above. To evaluate metabolic activity,

the cells were exposed to 30  $\mu$ g/mL of resazurin for 3 h and the fluorescence was recorded (560 nm/590 nm) in a microplate reader FlexStation II (Molecular Devices, San Jose, CA).

## 2.6 Immunogenicity assessment

Female BALB/c mice experimental groups (8–10 weeks old,  $n = 5$ ) were randomly established and assigned to one of the following treatments: mixture of the five target peptides (mpS) with Al(OH)<sub>3</sub> adjuvant (AH) at low dose (AH mpS L, 5  $\mu$ g of each peptide) or high dose (AH mpS H, 15  $\mu$ g of each peptide), peptides in PBST (5  $\mu$ g of each peptide) or the AuNP-PEG-peptide conjugates, hereafter identified as AuNP-P<sub>1</sub>, AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, AuNP-P<sub>4</sub>, AuNP-P<sub>5</sub> (corresponding to 5  $\mu$ g of the target peptide). Four subcutaneous doses (100  $\mu$ L of total volume) were administered at 2-week intervals (days 1, 15, 30, and 45). Blood samples were collected by tail puncture on days 0, 14, 29, 44, 59 and 104 (Figure 8A). Sera were separated by centrifuging 10 min at 1,200 × g and stored at –20°C until further analysis.

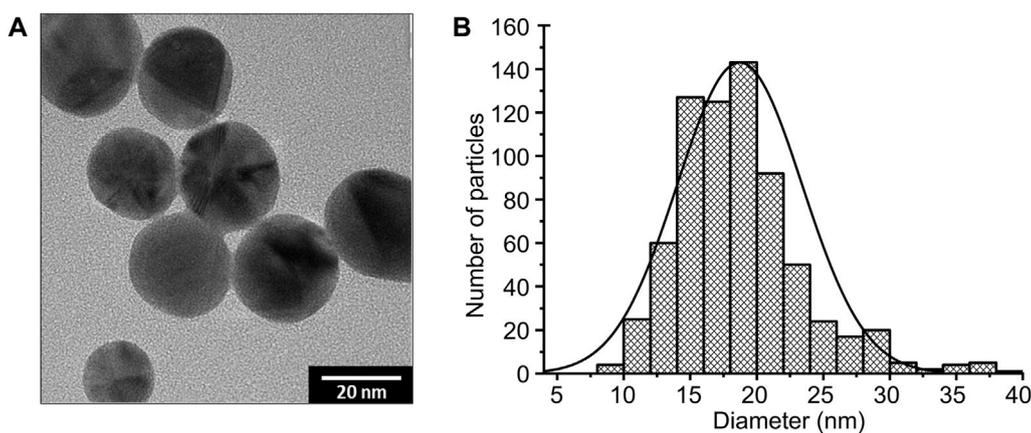
## 2.7 IgG and IgM ELISA analysis

96-well polystyrene plates were coated with each peptide for individual conjugate groups (150 ng/well), a peptide mix for the AH groups (500 ng/well), or with recombinant S protein (200 ng/well, Sino Biological Inc., 40,589-V08H4) diluted in 0.2 M carbonate buffer (pH = 9.6) and incubated overnight at 4°C. Three washes with 0.05% PBST were performed after each incubation. The plates were blocked with a 5% fat-free milk solution at room temperature for 2 h. Serial dilutions of the test sera were applied by triplicate and incubated overnight at 4°C. For secondary labeling, anti-mouse antibodies (IgM, IgG, IgG1, or IgG2a) conjugated with horseradish peroxidase were added and incubated for 2 h at 25°C. Detection was performed by adding ABTS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate and the optical density was recorded at 405 nm for 1 h using a microplate photometer Multiskan FC (Thermo-Fisher).

## 2.8 Flow cytometry

The effect of gold conjugates on the maturation of DC2.4 dendritic cells was assessed by flow cytometry. First, 3×10<sup>6</sup> cells were seeded in 2 mL of complete RPMI medium (supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM non-essential amino acids solution, 10 mM HEPES, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, and 2% FBS) in Petri dishes of 60 mm, which were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h before adding the conjugates. The cells were washed once with 1× PBS and treated with AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> (50  $\mu$ g/mL), LPS (100 ng/mL), or complete RPMI medium as the control for 24 h. The DC2.4 cells were washed, harvested in 1× PBS supplemented with 5% FBS, and the concentration adjusted to 5×10<sup>5</sup> cells per well.

The CD16 and CD32 Fc receptors were blocked in all samples with 25  $\mu$ L of anti-CD16/32 for 30 min on ice, washed twice by centrifugation (5 min at 1,200 rpm and 4°C) and immunostained for 25 min with the selected antibodies. Finally, the cells were washed once,



**FIGURE 2** Transmission electron microscopy (TEM) image of AuNP at 200 kV (A). Size distribution histogram including a Gaussian fit curve of 700 nanoparticles measured (B).

resuspended in fixative 1% buffered formalin, and stored at 4°C. Throughout the process, the cells were kept on ice and protected from light exposure. The antibodies and their isotype controls used were the following: isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD11c (FITC Armenian Hamster IgG isotype control), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD86 (PE Rat IgG2a isotype control), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD40 (APC Rat IgG2b isotype control), and streptavidin-PerCP/Cyanine5.5 (PerCP/Cyanine5.5 Armenian Hamster IgG isotype control)-conjugated with biotin anti-MHC class II (Biotin Rat IgG2b isotype control). Data were acquired in an Attune Nxt flow cytometer (Thermo-Fisher) and analyzed with FlowJo v.10 (BD Biosciences, Ashland, OR).

## 2.9 Statistical analysis

The statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Differences were considered significant when  $p$ -values were  $<0.05$  and the level of significance is indicated in the figure legends as  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ . The analysis was performed with OriginPro 2021 (OriginLab Corp, Northampton, MA).

## 3 Results

### 3.1 Morphological and physicochemical properties of gold conjugates

TEM imaging of 700 nanoparticles confirmed the spherical morphology of the AuNP synthesized with a diameter of  $18.70 \pm 4.70$  nm (Figure 2). The visible absorption spectrum of these as-prepared, citrate-capped AuNP exhibited a maximum absorption signal at 520 nm ( $\lambda_{\max}$ ), corresponding to the surface plasmon resonance characteristic of spherical nanoparticles of 20 nm (Haiss et al., 2007; Cheng et al., 2020). The analysis by DLS of these AuNP resulted in a  $d_H$  and  $\zeta$  potential values of 20.14 nm and  $-30.20$  mV, respectively.

Once functionalized as AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> and conjugated as AuNP-PEG-peptide, hereafter expressed as AuNP-PEG and AuNP-P<sub>*i*</sub> ( $i = 1, \dots, 5$ ), their main absorption signals red-shifted 1–2 nm, while their signal distribution remained similar (broadened only 2 nm with PEG), when comparing the normalized visible spectra (Vis) of both with that of AuNP. Moreover, their maximum absorbance remained at  $1.02 \pm 0.07$ , in range with that of AuNP ( $\approx 1$ ), while none exhibited secondary signals at longer wavelengths that would clearly indicate aggregation (Figure 3A).

The conjugation of peptides on PEG-functionalized AuNP was proven by tracking changes in their  $d_H$  and  $\zeta$  potential. These measurements evidenced AuNP with  $d_H$  increased 21.7 and  $31.7 \pm 1.8$  nm once pegylated and then conjugated, respectively; with polydispersity indexes (PdI) of  $0.2 \pm 0.04$ , consistent with suspensions having monodisperse size distributions. Moreover, none of the suspensions exhibited additional signals in the  $\mu$ m range that would correspond to aggregates (Figure 3B).

Compared to unmodified AuNP, the  $\zeta$  potential of AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> became less negative (attributed to the amino groups from PEG), reaching a value of  $-6.39$  mV in PBS (pH 7.4), while that of the conjugates ranged from  $-11.70$  to  $-5.87$  mV in the same buffer. Overall, the data confirmed changes in the surface of AuNP.

### 3.2 FTIR characterization

To confirm the nature of the coating on the gold nanoparticles after each modification, FTIR analysis was performed on desiccated samples (Figure 4). The FTIR spectrum of citrate-capped AuNP showed a broad band characteristic of O–H stretching in the  $3,657$ – $3,000$   $\text{cm}^{-1}$  range (1) and another at  $1,415$   $\text{cm}^{-1}$  corresponding to COO<sup>−</sup> symmetric stretching (10), in addition to two bands between  $2,912$ – $2,845$   $\text{cm}^{-1}$  of C–H asymmetric (3) and symmetric (4) stretching. AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> showed additional bands to those of citrate-capped AuNP that confirmed surface ligand exchange. The main bands correspond to the C–N stretching of amine I at  $1,257$   $\text{cm}^{-1}$  (12), C–O stretching of the

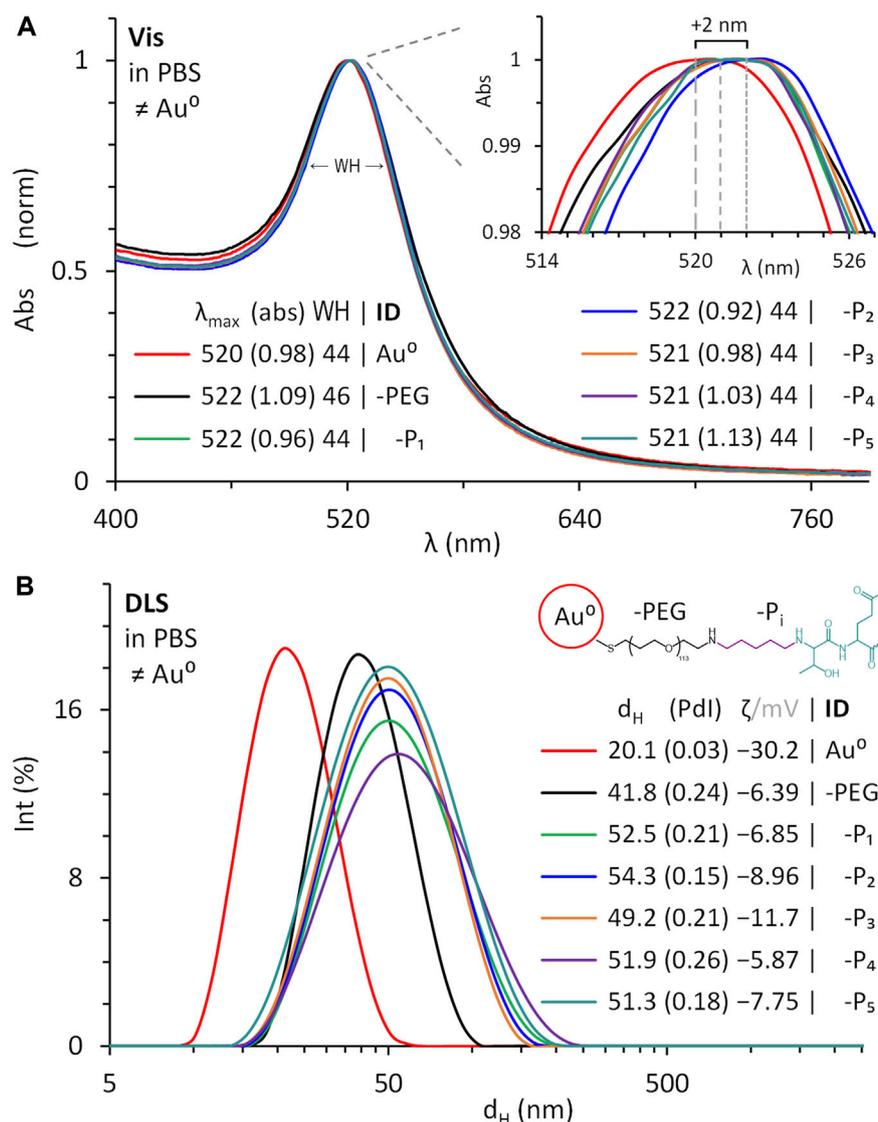


FIGURE 3

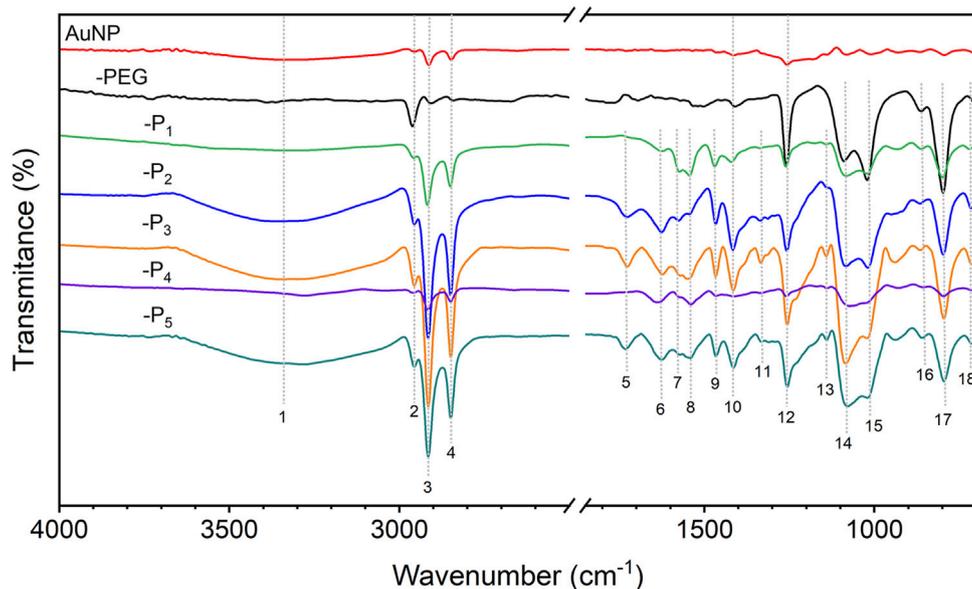
Normalized visible spectra (A) and dynamic light scattering (B) of as-prepared citrate-capped AuNP (Au<sup>0</sup>), compared to the functionalized with thiol-polyethylene glycol (PEG)-amine, and conjugated with the peptides selected (P<sub>1</sub> to P<sub>5</sub>) in PBS. Absorbance (abs) at  $\lambda_{\max}$ , full-width at half-maximum (WH), hydrodynamic diameter ( $d_H$ ), polydispersity index (Pdl), and  $\zeta$  potential at pH 6 for Au<sup>0</sup> and pH 7.4 for the reacted and suspended in PBS.

ether groups between 1,084–1,020 cm<sup>-1</sup> (14 and 15), and the C–H rocking band at 720 cm<sup>-1</sup> (18), known as the CH<sub>2</sub> long-chain band. It is important to note that the S–Au dative bond formation was consolidated with a small band at 451 cm<sup>-1</sup> (19) and the S–C stretching of the polyethylene glycol polymer chain was localized with a sharp band at 794 cm<sup>-1</sup> (17). Finally, for AuNP-PEG-P<sub>i</sub> the bands at 1725 and 1,622 cm<sup>-1</sup> (5 and 6) correspond to C=O stretching of carboxylic acid and amide II, as well as at 1,576 and 1,543 cm<sup>-1</sup> (7 and 8) for N–H bending of amine I and amide II, respectively, which validated the presence of conjugated peptides. Other bands found only in the gold conjugates were C–H bending of the methylene group (1,465 cm<sup>-1</sup>, 9), O–H bending of carboxylic acids (1,140 cm<sup>-1</sup>, 13) and phenol from the amino acid tyrosine present in the conjugates P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, and P<sub>5</sub> (1,333 cm<sup>-1</sup>, 11). Furthermore, amino acids exhibited a strong broad O–H band in

the 3,660–3,000 cm<sup>-1</sup> region due to the carboxylic acid and alcohols from amino acids such as serine, threonine, and tyrosine.

### 3.3 TGA characterization

The observed weight lost below 200°C was attributed to the evaporation of residual water in the sample and only the weight changes registered above 200°C were considered as part of the organic components of it. The thermogram for pure sodium citrate showed three mass losses, one of which was attributed to the partial degradation of sodium citrate at around 310°C and its residues at 450°C (Supplementary Figure S4) (Marquilla et al., 2018; F; Liu et al., 2018). The thermogram for pure HS-PEG5K-NH<sub>2</sub> showed a derivative peak at 380°C (Supplementary Figure S5) with a weight



**FIGURE 4**  
FTIR spectra of citrate-capped AuNP (Au<sup>0</sup>), after being functionalized with thiol-polyethylene glycol (PEG)-amine, and conjugated with peptides (P<sub>1</sub> to P<sub>5</sub>). The functional group assigned to each band number is in [Supplementary Table S2](#).

loss of 96.5%, similar to that of the functionalized and conjugated AuNP. Derivative peaks were also found around 350°C and 400°C, coinciding with references that attribute this mass loss to the decomposition of PEG (Qian et al., 2017; Lu et al., 2019).

As shown in [Figure 5](#), the citrate-capped AuNP had a weight loss of 0.99% at the end of the analysis, while for the PEG-functionalized AuNP the loss of organic material was notably higher. Considering the TGA signal changes, the PEG content in the sample is 8.3%, while in the conjugates is  $7.18\% \pm 0.98\%$ . These weight fractions were useful to calculate the grafting density ( $\sigma_{TGA}$ ) as reported before (Das et al., 2016), which was estimated at  $0.62 \pm 0.09$  molecules/nm<sup>2</sup> ([Supplementary Table S3](#)). The weight loss of organic material in the gold conjugates, from 200°C to 600°C, was  $12.44\% \pm 0.7\%$  ( $0.36 \pm 0.09$  mg), of which  $5.26\% \pm 1.2\%$  ( $0.15 \pm 0.01$  mg) corresponds to the conjugated peptide ([Supplementary Table S4](#)). Since the amount of peptide monolayers in the conjugates was  $1.14 \pm 0.25$  (HPLC analysis), this data was used to compare the amount of peptide bound to the AuNP according to the mass of peptide added to the conjugation reaction (theoretical), against the weight of peptide lost in the conjugates analyzed by TGA. Theoretically,  $0.12 \pm 0.02$  mg of peptide would have to be found in the gold conjugates and the thermogravimetric analysis indicated that there is actually  $0.15 \pm 0.01$  mg ([Supplementary Table S5](#)). This result supports the success of the conjugation strategy since the difference between both estimates is marginal.

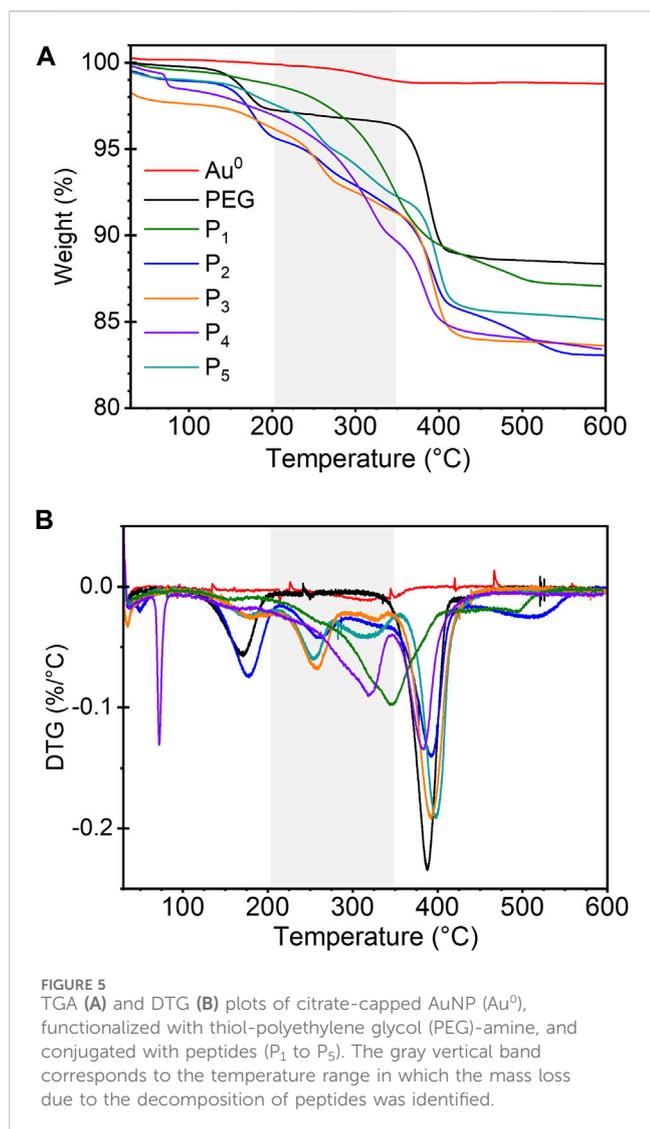
### 3.4 Determination of bound peptide

To determine the amount of bound peptide in each conjugate, the supernatants containing unbound peptide in the conjugation reactions were recovered and analyzed by reverse-phase HPLC. Multiple peak signals with different retention times were found

in the chromatograms of supernatants P<sub>1</sub> (four), P<sub>3</sub> (three), and P<sub>2</sub> (two) that could be attributed to the amount of reactive primary amines in their amino acid sequence (8, 8, and 5 primary amines, respectively), which could cross-link GTA ([Figure 6](#)). The concentration of each unbound peptide was calculated by interpolation with the corresponding calibration line ([Supplementary Figure S1](#)) and subtracted from the concentration measured in the unreacted controls with the same initial concentration to determine the amount of peptide bound or remaining in the colloidal suspension ([Supplementary Table S5](#)). The concentration of bound peptide was  $47.3 \pm 14.2$  µg/mL in freshly prepared conjugate suspensions with 2 mg/mL of AuNP. Considering 1 mg of Au<sup>0</sup>, from original suspensions of AuNP concentrated 20×, the amount of peptide chemisorbed per mass of AuNP is  $23.7 \pm 7.1$  µg/mg P<sub>i</sub>/Au<sup>0</sup>.

### 3.5 Cytotoxicity assay

To test whether AuNP are toxic at the cellular level, a HEK-293T cell line was exposed to a range of AuNP concentrations. Cellular cytotoxicity was measured at 24, 48, and 72 h of stimulation by measuring the metabolic activity of living cells, using the resazurin reduction method. The results showed that there is no significant difference between AuNP-PEG and AuNP-mpS regardless of the material concentration ( $p > 0.05$ ; [Figure 7](#)). After 24 h of incubation with the functionalized nanoparticles, a slight decrease in metabolic activity was observed from 100 µg/mL. However, this effect was not significant. Remarkably, 48 h after adding the stimulus there was a statistically significant decrease of cell viability from 100 µg/mL of AuNP-PEG and 250 µg/mL of AuNP-mpS ( $p < 0.05$ ), which might suggest a higher toxicity for AuNP-PEG. However, for the treatment at the higher concentration (1,000 µg/mL) evaluated at 72 h post-



exposure, the values for AuNP-PEG were higher (mean value: 71%) respect AuNP-mpS (mean value: 64%); therefore no consistent trend was observed for the viability decrement induced by the test materials. Moreover, after 72 h of stimulation, cell viability was recovered with both treatments, up to 87% with AuNP-PEG and 91% with AuNP-mpS at the highest concentration added, reaching values that were not statistically different respect the control ( $p > 0.05$ ). Therefore, the general pattern observed for the metabolic activity of the cells exposed to either AuNP-PEG or AuNP-mpS comprised a transient negative effect on the metabolic activity at the 48 h post-exposure with a restoration at the normal levels at 72 h post-exposure, which justified the *in vivo* evaluation of AuNP-mpS as such nanomaterials were not found to be inherently toxic.

### 3.6 Immune response induced by AuNP conjugates in mice

The ability of the proposed AuNP-PEG-peptide conjugates to increase the immunogenicity of each peptide was tested by immunizing mice with individual conjugates and comparing the

induced humoral response to that attained in a group treated with the cocktail of peptides adjuvanted with alum (HA). ELISA data revealed that IgM induction occurred after priming, reaching maximum levels after boosting (day 30), followed by a remarkable decrease (Figure 8B). In contrast, the IgG response was triggered after the third dose with either conjugate or peptides in alum, reaching its maximum levels on day 45 (Figure 8C). Mice that received the high dose of peptides in alum produced significantly higher levels of anti-mpS IgM than the mice in the low dose group, but the IgG levels did not show a dose-dependent effect ( $p < 0.05$ ).

It is important to note that the AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> conjugates induced the highest concentration of IgG antibodies, which lasted for up to 2 months after the last immunization (Figure 8C,  $p < 0.001$ ). The mice immunized with the AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> conjugates reached significantly higher IgG antibody titers with respect to the other groups (namely, AuNP-P<sub>1</sub>, AuNP-P<sub>4</sub> and HA groups at two dose levels, Figure 9A), with an IgG1 subclass predominancy over IgG2a (Figure 9B).

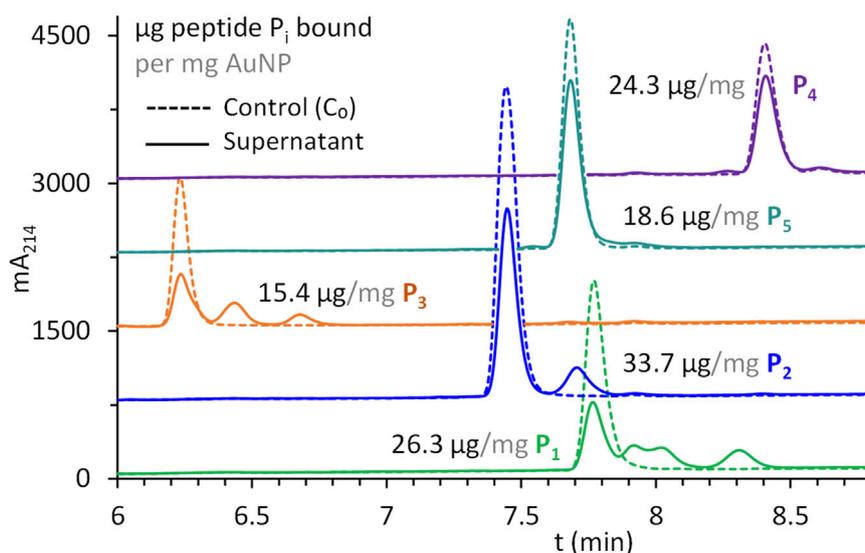
To evidence the ability of the antibodies induced by the conjugates to recognize the native target (S protein), ELISA was performed using the recombinant full length S protein as target antigen. The results showed an IgG antibodies titer induced by AuNP-P<sub>1</sub> that was 8-fold higher than that obtained against P<sub>1</sub>. In this case, the antibodies induced by the AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> conjugates revealed lower titers than those obtained against the respective peptide and did not represent a statistically significant difference with respect to AuNP-P<sub>4</sub> and high-dose AH (Figure 9C).

### 3.7 Maturation of dendritic cells

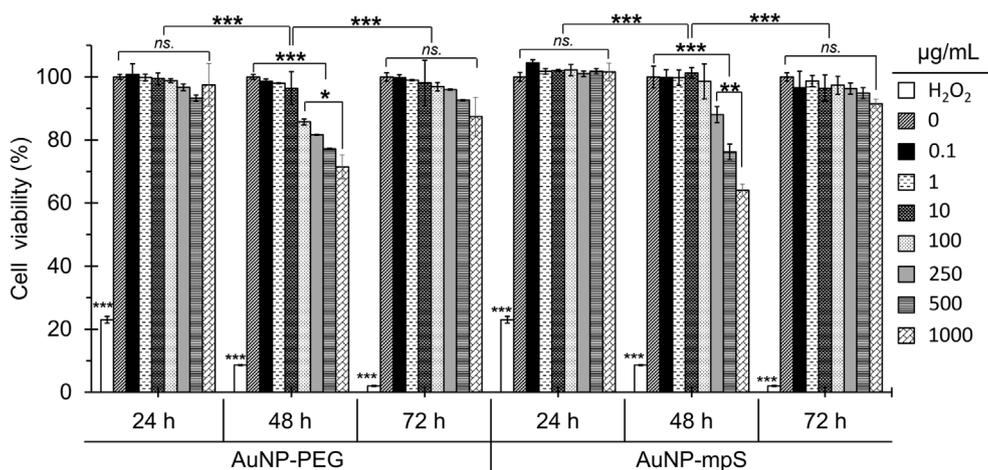
The effect of the functionalized AuNP on dendritic cell maturation was evaluated by flow cytometry of DC2.4 cells stimulated for 24 h with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>. Compared against control cells treated with vehicle only, the AuNP were found to induce cell maturation by enhancing the expression of the costimulatory molecule CD86, whereas the CD40 expression was decreased (Figure 10).

## 4 Discussion

Aluminum hydroxides are by far the most used adjuvants in vaccines in part due to their low cost and the fact that are patent-free (Shardlow et al., 2018). However, several studies have shown that this type of adjuvants do not induce long-lasting immune responses against SARS-CoV-2. In the present study, AuNP-based conjugates targeting peptides from SARS-CoV-2 were synthesized and characterized *in vitro* and *in vivo* as an effort to trigger the development of innovative nanovaccines against COVID-19, not depending on conventional adjuvants that tend to be poorly effective or those with patents that restricts their use in developing countries. Overall, the synthesis and conjugation approach followed to obtain the AuNP-peptide conjugates were efficient, allowing to obtain conjugates with enough antigen concentration for *in vitro* and *in vivo* evaluations. The use of heterobifunctional HS-PEG5k-NH<sub>2</sub>



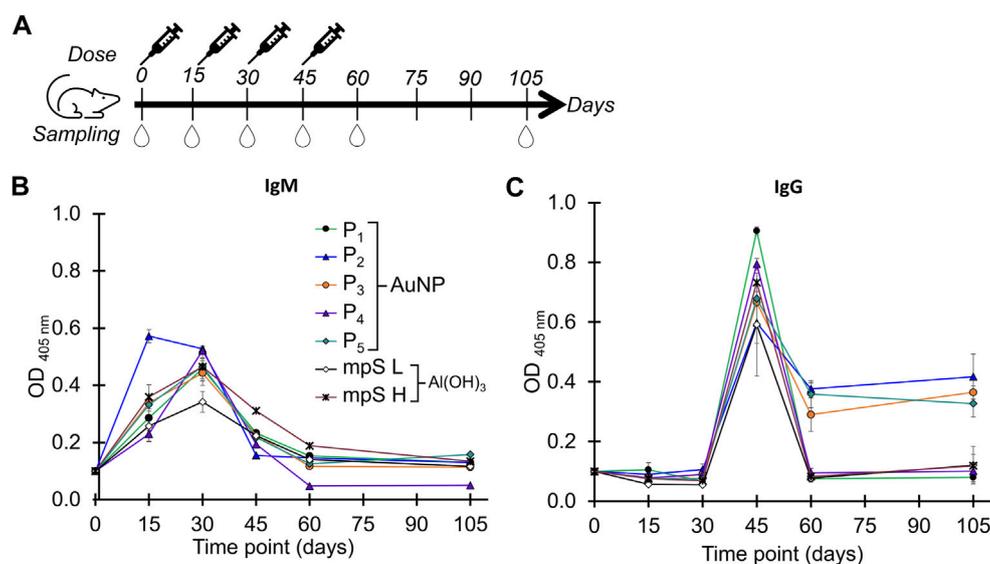
**FIGURE 6** Peptides P<sub>1</sub> to P<sub>5</sub> quantified by HPLC from supernatants recovered after their conjugation with AuNP and compared to unreacted peptides at the same initial concentration (C<sub>0</sub>). Amount of peptide bound calculated as µg of peptide per mg of AuNP from absorbance values at 214 nm.



**FIGURE 7** Toxicity assessment of the mix of AuNP-peptide conjugates (AuNP-mpS) and AuNP functionalized with thiol-polyethylene glycol-amine (AuNP-PEG). The viability of HEK293-T cells treated at different time intervals was analyzed by the resazurin reduction. Only the 24 h treatment with AuNP-PEG and AuNP-mpS induced a significant decrease in cell viability, reaching 64% and 71%, respectively, with 1,000 µg/mL. No differences in cell viability were found between cells treated with conjugated or functionalized AuNP. Significance values were determined using two-way ANOVA with Turkey test. Significant differences are indicated as \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, and non-significant differences as *ns*.

facilitated the conjugation of peptides by activating the amino-terminal group with GTA. This *bis*-aldehyde crosslinker is widely used for the reactivity of the aldehyde group with primary or secondary amines in proteins, which produces a stable secondary amine and leaves an exposed aldehyde group for subsequent reductive amination reactions (Hermanson, 2013). The reaction induces the formation of Schiff bases, for which reductants such as NaBH<sub>4</sub> are used, allowing the stabilization of secondary amine bonds (Ibrahim et al., 2018). The sequence of amino acids in proteins and peptides can have effects on the reactivity of GTA,

mainly in short peptides. The peptides used in this work contain amino acids with amino groups in ionizable side chains that are strong nucleophiles in addition reactions. In the chromatograms of conjugation supernatants, peptides P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, and P<sub>3</sub> exhibited multiple signals at different retention times which, as mentioned above, may be associated to their amino acid sequence. For example, P<sub>1</sub> and P<sub>3</sub> showed four and three signals, respectively, and are the peptides that contain the highest number of reactive amines, followed by P<sub>2</sub> with two reactive amines and two signals in their chromatogram. Particularly, P<sub>1</sub> contains two contiguous lysine residues that,

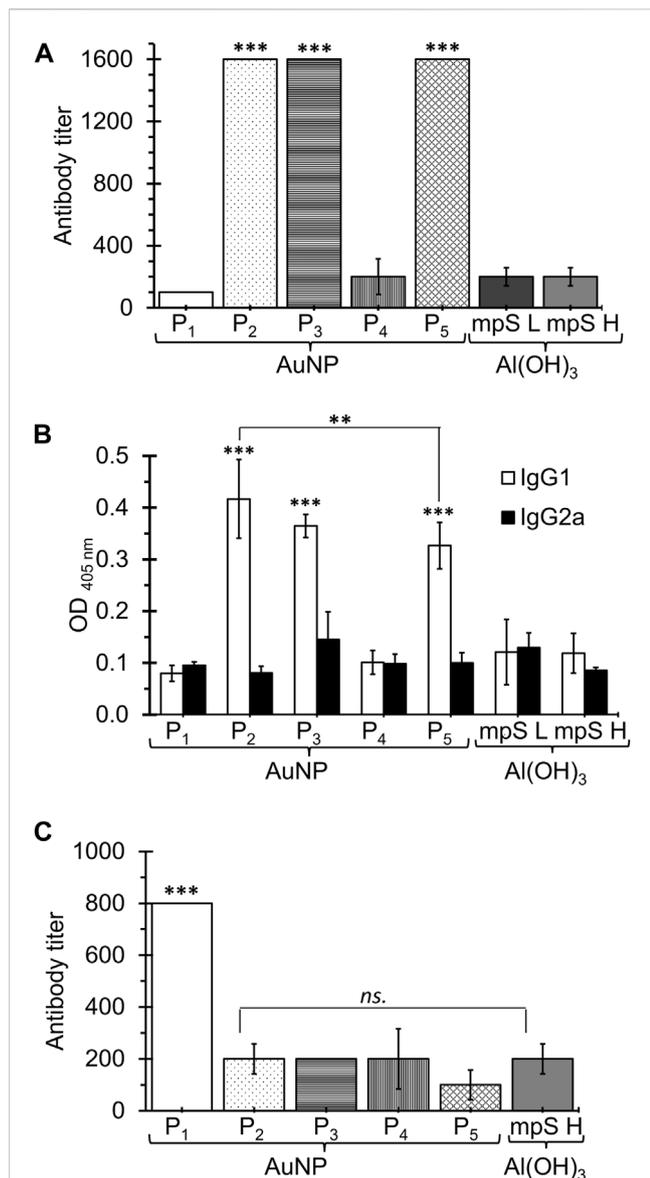


when reacted with a cyclic form of GTA (aldol), can form quaternary pyridinium compounds, as well as a powerful nucleophile such as arginine. P<sub>3</sub> contains two contiguous arginine residues in its structure and P<sub>2</sub> contains one residue, but neither contains lysine. Although P<sub>5</sub> and P<sub>4</sub> have three and two lysine residues widely distributed in their sequence, respectively, their chromatogram showed a single peak with no apparent by-product formation between the unbound peptide and the remaining GTA in solution.

Comparable to citrate-capped AuNP, the pegylated and peptide-conjugated AuNP have analogous stability characteristics considering the similarity of their absorption signals and size distributions. The less negative  $\zeta$  potentials of AuNP-PEG ( $-6.4$  mV) and AuNP-P<sub>i</sub> ( $-8.3 \pm 2.2$  mV) are due to the adsorption of phosphate anions after washing and resuspending in PBS, a buffer used as excipient for both in cytotoxicity and immunogenicity assays. The stability of the conjugates is remarkable considering that in the herein proposed chemisorption of peptides on AuNP their surface properties change after reacting them sequentially with i) HS-PEG5k-NH<sub>2</sub>, ii) GTA, and iii) one of five different peptides ( $1912 \pm 286$  Da), with washing cycles consisting of centrifugation and resuspension in  $1\times$  PBS, and finally concentrated;  $20\times$  for biological assays and  $100\times$  for physical-chemical characterization. Considering that after GTA activation the amount of peptide equivalent to four monolayers was added, the bound fraction was expected to correspond to one monolayer of peptide on the polyethylene glycol coating. Therefore, unreacted (soluble) peptide controls analyzed by HPLC were prepared at the concentration of four monolayers. This analysis made it possible to demonstrate that the amount of peptide conjugated to the gold nanoparticles corresponds to  $1.14 \pm 0.25$  monolayers, equivalent to  $23.7 \pm 7.1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

The density of PEG influences the conformation it acquires on the surface of the nanoparticles and defines the degree of interaction with circulating proteins, by increasing the density of PEG, the degree of interaction with serum proteins and the clearance of the nanomaterial by the mononuclear phagocytic system decreases (Escareno et al., 2018). In a similar PEGylation of AuNP of 20 nm reported with HS-PEG5k-NH<sub>2</sub> the  $d_H$  increased 26 nm, with PEG/AuNP molar ratios starting at 500, finding that only the AuNP-PEG from molar ratios starting from 300 and up to 2000 could be centrifuged and resuspended in water (Chen et al., 2013). In our study, the amount of basically the same heterobifunctional PEG to coat one monolayer on AuNP was calculated, corresponding to a molar ratio of 900 compared to the recently consulted reference, adding five times in excess to secure a brush conformation in order to obtain more primary amino groups available on the surface for the subsequent reaction steps. It is known that the relationship between the radius occupied by a PEG chain, known as the Flory radius ( $R_F$ ), and the distance between the PEG chains ( $D$ ) allows to estimate of the conformation that PEG molecules acquire on the surface of nanoparticles (Cruje and Chithrani, 2014; Maurel et al., 2021). In this work, the  $R_F/D$  ratio has a value of 4.11, indicating that the PEG chains acquire a brush conformation in both functionalized AuNP and conjugates.

It has been documented that the functionalization of AuNP with polyethylene glycol improves the biocompatibility of the nanomaterial and optimizes the cell internalization (Foroozandeh and Aziz, 2018; Bekić et al., 2019). The resazurin assay revealed that both conjugated and functionalized nanoparticles had no toxic effect on HEK293T cells in a 0.1–1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  range after 24 and 72 h of treatment. However, the nanomaterial reduced the cell viability up to 30–40% after 48 h of treatment from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  onwards, but this activity was normalized 24 h later. This behavior is consistent with



**FIGURE 9** Anti-peptide IgG titers (A) and IgG1 and IgG2a serum levels (B) induced by immunization with the individual conjugates or with low-dose (5 µg) or high-dose (15 µg) HA adjuvant. Anti-Spike protein IgG titers induced by the individual conjugates or high-dose HA adjuvant (C). Antibody titers were determined by ELISA on serial dilutions of test sera on day 45. Serum levels of IgG1 and IgG2a subclasses were determined by ELISA at a 1:200 dilution on day 45. Significance values were determined using two-way ANOVA with Turkey test. Significant differences are indicated as \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, and non-significant differences as *ns*.

previous reports in which a greater toxic effect was observed after 48 h under AuNP-treatment of HeLa (Manivasagan and Oh, 2015), 1BR3, and A375 cells (Mioc et al., 2018). The cytotoxic effect of AuNP has been attributed to various factors such as particle size, dose, surface modification, and oxidative stress (Manivasagan and Oh, 2015). This last factor is influenced by the interaction of AuNP with biomolecules such as nucleic acids, proteins, and membrane lipids (Negahdary et al., 2015; Akhtar et al., 2012). A key factor in the antioxidant defense system and restoration of cell viability is intracellular glutathione concentration, which has been shown to

delay cell death in pre-treated HeLa and NHDF cells exposed to AuNP in the 0.028–100 µg/mL range (Akhtar et al., 2012; Lee et al., 2019). Although the performed *in vitro* assays allowed to justify the safety of the obtained conjugates, further studies will be aimed at elucidating the precise molecular mechanism involved in the cytotoxic effect observed in this study and how the intracellular processing of AuNP is managed once the nanomaterial has been internalized; also, evaluating the acute effects of the AuNP-based conjugates in the cells at the injection site is a relevant objective to better validate the safety of the proposed vaccine.

In terms of immunogenicity, the AuNP conjugates obtained induced higher antibody levels when compared to alum, especially AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub>, with IgG antibody titers increased up to eight-fold higher and lasting up to 2 months after the last immunization. It is important to note that mice immunized with AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> showed a marked predominance of the IgG1 subclass. This behavior in the IgG1/IgG2 ratio was similar to that observed in our previous work with peptide S<sub>461-493</sub> (Farfán-Castro et al., 2021), and is in agreement with previous reports where the polarization of the response towards the IgG1 subclass is attributed to the immunomodulatory properties of AuNP (Shinchi et al., 2019; Liu et al., 2021; Xu et al., 2021). In ELISA against the full-length protein S, lower IgG antibody titers were recorded when compared to the assays targeting the corresponding synthetic peptides. AuNP-P<sub>1</sub> was the only case showing a significant response, which was four-fold higher with respect to titers of the other groups. Surprisingly, such titers observed for AuNP-P<sub>1</sub> were eight-fold higher than those observed in the ELISA targeting the P<sub>1</sub> peptide, which could be attributed to a lower adsorption of the peptide to the surface of the well. Overall, these data suggest that AuNP-P<sub>1</sub> is effective at inducing functional antibodies capable of binding the native S protein. However, it is possible that the antibodies induced by AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub>, and AuNP-P<sub>5</sub> could protect by recognizing the S protein in other conformations or mediate protection by other mechanisms different to viral entry blockade. One unexpected result is the inability of AuNP-P<sub>1</sub> and AuNP-P<sub>4</sub> conjugates to be immunogenic in mice, which could be associated to a deleterious effect of the coupling approach on the antigen display impeding the induction of humoral responses.

AuNP have been used as antigen carriers in several vaccines under development against a variety of pathogens. These nanovaccine candidates have generally produced positive immunological outcomes. Some mechanisms of activation of the immune system by AuNP include the activation of the NLRP3 inflammasome and secretion of related cytokines such as IL-1β and IL-18, as reported by Niikura et al. (2013) in bone-marrow-derived dendritic cells treated with gold nanorods coated with the West Nile virus envelope protein. AuNP have been shown to provide anti-inflammatory protection in macrophages by activating the Keap1/Nrf2 signaling pathway, and to induce NFκB signaling pathway in dendritic cells, which is related with their maturation and immune tolerance avoidance (Goldstein et al., 2016; Horwitz et al., 2021). In the present study, AuNP-PEG showed to enhance CD86 expression in the murine DC2.4 line, which suggests that one possible mechanism

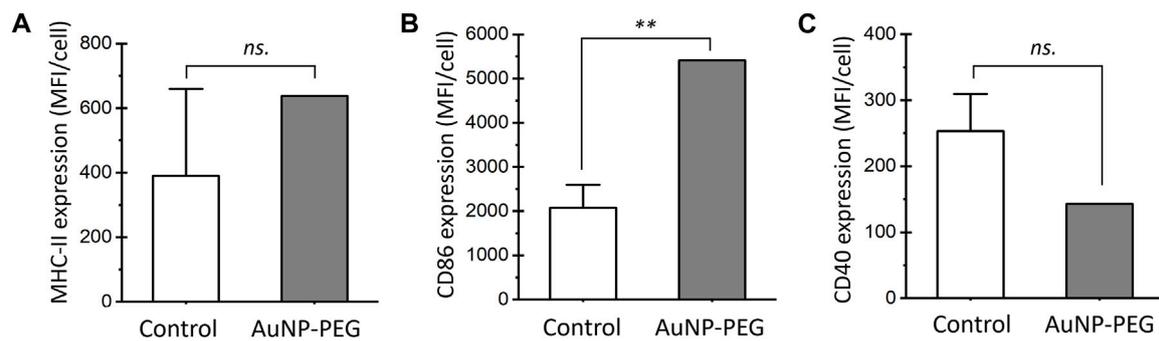


FIGURE 10

*In vitro* dendritic cell maturation assay. Expression of maturation markers MHC-II (A), CD86 (B), and CD40 (C) in DC2.4 cells that express CD11c. DCs were exposed for 24 h to 50 µg/mL of AuNP-PEG. The results are mean fluorescence intensity (MFI) values for each marker. Significance values were determined using two-way ANOVA with Turkey test. Significant differences are indicated as \*\* $p < 0.01$  and non-significant differences as ns.

explaining the adjuvant effect of this type of nanomaterial is their impact on DC maturation for a better antigen presentation. It has been described that DC undergo a complex maturation process which includes differences on the expression of the molecules of the major histocompatibility complex (MHC) and co-stimulatory molecules across the time (Macagno et al., 2007). This could be the reason for the differences found in the expression of CD86 and CD40 at the time of evaluation.

There are few vaccines against SARS-CoV-2 based on inorganic nanomaterials. An example is the AuNP-adjuvanted S protein vaccine tested in BALB/c mice (Sekimukai et al., 2020), which elicited a significant IgG response but could not mitigate eosinophilic infiltration due to the allergic inflammatory response. Kumar et al. (2021) also developed a gold-nanostar-chitosan DNA vaccine encoding the S protein against SARS-CoV-2 for intranasal immunization, which induced high levels of anti-SARS-CoV-2 IgA in lung mucosa, neutralization of pseudoviruses, and enhanced tissue-resident memory T cells.

Most vaccines need a cold chain to maintain the stability of the components during storage and distribution, until the immunogen is finally administered. Nevertheless, maintaining the cold chain can be difficult in locations with challenging access and involves monetary investment in refrigerated equipment. A benefit of AuNP-based vaccines is their thermal stability, even with temperature fluctuations, which reduces costs by eliminating the need for a cold chain. This is supported by the findings of Ingrole et al. (2021), who demonstrated that their lyophilized AuNP-based influenza A vaccine maintained its stability and immunogenicity for up to 3 months when stored at temperatures ranging from 4°C to 50°C, even when kept in its freeze-dried state and reconstituted in water. The reduced amount of antigen or adjuvants required in AuNP-based nanovaccines to elicit robust immune responses is another attractive feature of these platforms, and the surface antigens can be easily modified once the conjugation technique has been standardized.

It is important to expand the preclinical evaluation of the AuNP-P<sub>1-5</sub> conjugates under good laboratory practices and good manufacturing practices. In this regard, some of the most

promissory are the naNO-DENGUE (NCT04935801) and naNO-COVID (NCT05113862) Phase-I clinical trials from Emergex Vaccines Holding Ltd., against Dengue and SARS-CoV-2, respectively. These vaccines consist of T-cells primed with specific cocktail of peptides from the respective viruses attached to AuNP. The naNO-COVID vaccine protected mice of lung inflammation after intranasal challenge with SARS-CoV-2 in preclinical studies (Emergex Vaccines, 2022). Ultimately, neutralization assays based on SARS-CoV-2 or pseudoviruses displaying the S protein are needed to ascertain the potential of these vaccine candidates. Moreover, assays to assess Fc-mediated phagocytosis and antibody-dependent cellular cytotoxicity could aid on determining additional mechanisms by which the obtained AuNP conjugates could result in immune protection against COVID-19 before evaluating these candidates in infectious challenge models.

In conclusion, this study expands the evidence on the potential of using AuNP as safe and effective carriers for nanovaccine design since the obtained AuNP-P<sub>2</sub>, AuNP-P<sub>3</sub> and AuNP-P<sub>5</sub> conjugates did not induce irreversible *in vitro* cytotoxic effects and remarkably were able to induce robust and long-lasting antigen-specific IgG response in mice, with an IgG1 subclass predominance; surpassing the response induced by the conventional alum adjuvant. Moreover, the data obtained represent a step forward on the development of fully synthetic vaccines that could provide a solution for the need of thermostable vaccines targeting conserved regions from the S protein, with the potential to provide long-term and broad protection against SARS-CoV-2 VOC not depending on conventional adjuvants, which is a limitation for vaccine developers that has a priority to focus on formulations based on patent-free components.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

## Ethics statement

The animal study was approved by the Comité de Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (approval number: CEID-2020-07R1). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

## Author contributions

SF-C: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft. MG-S: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Validation, Writing—review and editing. LB-M: Methodology, Validation, Writing—review and editing. JC: Methodology, Validation, Writing—review and editing. RS: Methodology, Validation, Writing—review and editing. OG-O: Conceptualization, Formal Analysis, Supervision, Writing—review and editing. SR-M: Conceptualization, Funding acquisition, Writing—original draft, Writing—review and editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research

## References

- Akhtar, M. J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M. M., Ahmad, J., and Alrokayan, S. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int. J. Nanomedicine* 7, 845–857. doi:10.2147/IJN.S29129
- Amrun, S. N., Lee, C.Y.-P., Lee, B., Fong, S.-W., Young, B. E., Chee, R.S.-L., et al. (2020). Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine* 58, 102911. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102911
- Bartczak, D., and Kanaras, A. G. (2011). Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir* 27 (16), 10119–10123. doi:10.1021/la2022177
- Bekić, M., Tomić, S., Rudolf, R., Milanović, M., Vučević, D., Anžel, I., et al. (2019). The effect of stabilisation agents on the immunomodulatory properties of gold nanoparticles obtained by ultrasonic spray pyrolysis. *Mater. (Basel, Switz.)* 12 (24), 4121–4215. doi:10.3390/MA12244121
- Callaway, E. (2020). The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature* 580 (7805), 576–577. doi:10.1038/d41586-020-01221-y
- Chen, H., Paholak, H., Ito, M., Sansanaphongpricha, K., Qian, W., Che, Y., et al. (2013). Living PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. *Nanotechnology* 24 (1–9), 355101. doi:10.1088/0957-4484/24/35/355101
- Cheng, L., Zhu, G., Liu, G., and Zhu, L. (2020). FDTD simulation of the optical properties for gold nanoparticles. *Mater. Res. Express* 7 (12), 125009. doi:10.1088/2053-1591/abd139
- Chung, J. Y., Thone, M. N., and Kwon, Y. J. (2021). COVID-19 vaccines: the status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170, 1–25. doi:10.1016/j.addr.2020.12.011
- Climent, N., García, I., Marradi, M., Chiodo, F., Miralles, L., Maleno, M. J., et al. (2018). Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannoses enhance HIV-specific T cell responses. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 14 (2), 339–351. doi:10.1016/j.nano.2017.11.009
- CoVariants (2020). Available at: <https://covariants.org/> (Accessed October 17, 2023).
- Cruje, C., and Chithrani, D. B. (2014). Polyethylene glycol functionalized nanoparticles for improved cancer treatment. *Rev. Nanosci. Nanotechnol.* 3 (1), 20–30. doi:10.1166/rnn.2014.1042
- Dai, L., and Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 73–82. doi:10.1038/s41577-020-00480-0
- Das, J., Choi, Y.-J., Yasuda, H., Han, J. W., Park, C., Song, H., et al. (2016). Efficient delivery of C/EBP beta gene into human mesenchymal stem cells via polyethylenimine-

was funded by CONAHCYT (grant number 848290) and by PRODEP (grant UASLP-PTC-625).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnano.2024.1335346/full#supplementary-material>

coated gold nanoparticles enhances adipogenic differentiation. *Sci. Rep.* 6 (1), 33784. doi:10.1038/srep33784

Dykman, L. A., Staroverov, S. A., Fomin, A. S., Khanadeev, V. A., Khlebtsov, B. N., and Bogatyrev, V. A. (2018). Gold nanoparticles as an adjuvant: influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production. *Int. Immunopharmacol.* 54, 163–168. doi:10.1016/j.intimp.2017.11.008

EMA (2021). *Regulatory requirements for vaccines intended to provide protection against variant strain(s) of SARS-CoV-2 - scientific guideline*. Ene. European Medicines Agency. Amsterdam, Netherlands. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/regulatory-requirements-vaccines-intended-provide-protection-against-variant-strains-sars-cov-2> (Accessed 23, 2023).

Emergex Vaccines (2022). Emergex provides an update on first-in-human studies of its novel Dengue fever and coronavirus T cell adaptive vaccines. Available at: <https://emergexvaccines.com/emergex-provides-an-update-on-first-in-human-studies-of-its-novel-dengue-fever-and-coronavirus-t-cell-adaptive-vaccines/> (Accessed October 17, 2023).

Escareno, N., Topete, A., Taboada, P., and Daneri-Navarro, A. (2018). Rational surface engineering of colloidal Drug delivery systems for biological applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 18 (14), 1224–1241. doi:10.2174/1568026618666180810145234

Farfán-Castro, S., García-Soto, M. J., Comas-García, M., Arévalo-Villalobos, J. I., Palestino, G., González-Ortega, O., et al. (2021). Synthesis and immunogenicity assessment of a gold nanoparticle conjugate for the delivery of a peptide from SARS-CoV-2. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 34, 102372. doi:10.1016/j.nano.2021.102372

Favi, P. M., Gao, M., Johana Sepúlveda Arango, L., Ospina, S. P., Morales, M., Pavon, J. J., et al. (2015). Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: gold nanospheres versus gold nanostars. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 103 (11), 3449–3462. doi:10.1002/jbm.a.35491

Foroozandeh, P., and Aziz, A. A. (2018). Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 13 (1), 339. doi:10.1186/s11671-018-2728-6

Ghafari, M., Watson, O. J., Karlinsky, A., Ferretti, L., and Katzourakis, A. (2022). A framework for reconstructing SARS-CoV-2 transmission dynamics using excess mortality data. *Nat. Commun.* 13 (1), 3015. doi:10.1038/s41467-022-30711-y

Goldstein, A., Soroka, Y., Frušić-Zlotkin, M., Lewis, A., and Kohen, R. (2016). The bright side of plasmonic gold nanoparticles: activation of Nrf2, the cellular protective pathway. *Nanoscale* 8 (22), 11748–11759. doi:10.1039/c6nr02113a

- Gulla, S. K., Rao, B. R., Moku, G., Jinka, S., Nimmu, N. V., Khalid, S. H., et al. (2019). In vivotargeting of DNA vaccines to dendritic cells using functionalized gold nanoparticles. *Biomaterials Sci.* 7 (3), 773–788. doi:10.1039/c8bm01272e
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Anal. Chem.* 79 (11), 4215–4221. doi:10.1021/ac0702084
- Heffron, A. S., McIlwain, S. J., Amjadi, M. F., Baker, D., Khullar, S., Sethi, A. K., et al. (2020). *The landscape of antibody binding in SARS-CoV-2 infection*. Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island, New York. bioRxiv. doi:10.1101/2020.10.10.334292
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate techniques*. Amsterdam: Acad. Press.
- Horwitz, D. A., Bickerton, S., and La Cava, A. (2021). Strategies to use nanoparticles to generate CD4 and CD8 regulatory T cells for the treatment of SLE and other autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 12, 681062. doi:10.3389/fimmu.2021.681062
- Ibrahim, N. A., Nada, A. A., and Eid, B. M. (2018). “Polysaccharide-based polymer gels and their potential applications,” in *Polymer gels. Gels horizons: from science to Smart materials* (Singapore: Springer). doi:10.1007/978-981-10-6083-0\_4
- Ingrele, R. S. J., Tao, W., Joshi, G., and Gill, H. S. (2021). M2e conjugated gold nanoparticle influenza vaccine displays thermal stability at elevated temperatures and confers protection to ferrets. *Vaccine* 39 (34), 4800–4809. doi:10.1016/j.vaccine.2021.07.032
- Johnson, P. B., and Christy, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B* 6 (12), 4370–4379. doi:10.1103/physrevb.6.4370
- Kang, Y.-F., Sun, C., Zhuang, Z., Yuan, R.-Y., Zheng, Q., Li, J.-P., et al. (2021). Rapid development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates. *ACS Nano* 15 (2), 2738–2752. doi:10.1021/acsnano.0c08379
- Krishnamoorthy, S., Swain, B., Verma, R. S., and Gunthe, S. S. (2020). SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *VirusDisease* 31, 411–423. doi:10.1007/s13337-020-00632-9
- Kumar, U. S., Afjei, R., Ferrara, K., Massoud, T. F., and Paulmurugan, R. (2021). Gold-nanostar-chitosan-mediated delivery of SARS-CoV-2 DNA vaccine for respiratory mucosal immunization: development and proof-of-principle. *ACS Nano* 15 (11), 17582–17601. doi:10.1021/acsnano.1c05002
- Lee, E., Jeon, H., Lee, M., Ryu, J., Kang, C., Kim, S., et al. (2019). Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study. *Sci. Rep.* 9 (1), 2494. doi:10.1038/s41598-019-39579-3
- Li, L., Zhao, Z., Yang, X., Li, W., Chen, S., Sun, T., et al. (2020). Identification of four linear B-cell epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein able to elicit neutralizing antibodies. *bioRxiv*. Long Island, New York. Cold Spring Harbor Laboratory. doi:10.1101/2020.12.13.422550
- Li, Y., Jin, Q., Ding, P., Zhou, W., Chai, Y., Li, X., et al. (2020). Gold nanoparticles enhance immune responses in mice against recombinant classical swine fever virus E2 protein. *Biotechnol. Lett.* 42 (7), 1169–1180. doi:10.1007/s10529-020-02853-w
- Liu, F., Vander Elst, L., Müller, R. N., and Laurent, S. (2018). Structure of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@CdTe nanocomposite with core/shell structure for high-performance Bi-modal imaging. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects* 538, 467–473. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.10.081
- Liu, Y., Wang, Z., Fan, Y., Li, M., Zhu, H., Wang, K., et al. (2021). The adjuvant of  $\alpha$ -galactosylceramide presented by gold nanoparticles enhances antitumor immune responses of MUC1 antigen-based tumor vaccines. *Int. J. Nanomedicine* 16, 403–420. doi:10.2147/ijn.s273883
- Lu, J., Xue, Y., Shi, R., Kang, J., Zhao, C.-Y., Zhang, N.-N., et al. (2019). A non-sacrificial method for the quantification of poly(ethylene glycol) grafting density on gold nanoparticles for applications in nanomedicine. *Chem. Sci.* 10 (7), 2067–2074. doi:10.1039/c8sc02847h
- Macagno, A., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* 28 (5), 227–233. doi:10.1016/j.it.2007.03.008
- Manivasagan, P., and Oh, J. (2015). Production of a novel fucoidanase for the green synthesis of gold nanoparticles by streptomycetes sp. and its cytotoxic effect on HeLa cells. *Mar. Drugs* 13 (11), 6818–6837. doi:10.3390/md13116818
- Marcilla, A., Gómez-Siurana, A., Beltrán, M., Martínez-Castellanos, I., Blasco, I., and Berenguer, D. (2018). TGA-FTIR study of the pyrolysis of sodium citrate and its effect on the pyrolysis of tobacco and tobacco/SBA-15 mixtures under N<sub>2</sub> and air atmospheres. *J. Sci. Food Agric.* 98 (15), 5916–5931. doi:10.1002/jsfa.9121
- Maurel, M., Montheil, T., Martin, J., Chaar, L., Guzman-Gonzalez, V., Couvet, M., et al. (2021). Design of PEGylated three ligands silica nanoparticles for multi-receptor targeting. *Nanomaterials* 11 (1), 177. doi:10.3390/nano11010177
- McLean, G., Kamil, J., Lee, B., Moore, P., Schulz, T. F., Muik, A., et al. (2022). The impact of evolving SARS-CoV-2 mutations and variants on COVID-19 vaccines. *mBio* 13 (2), e0297921. doi:10.1128/mbio.02979-21
- Meka, R. R., Mukherjee, S., Patra, C. R., and Chaudhuri, A. (2019). Shikimoyl-ligand decorated gold nanoparticles for use in *ex vivo* engineered dendritic cell based DNA vaccination. *Nanoscale* 11 (16), 7931–7943. doi:10.1039/c8nr10293g
- Mioc, M., Pavel, I. Z., Ghiulai, R., Coricovac, D. E., Farcaș, C., Mihali, C.-V., et al. (2018). The cytotoxic effects of betulin-conjugated gold nanoparticles as stable formulations in normal and melanoma cells. *Front. Pharmacol.* 9, 429. doi:10.3389/fphar.2018.00429
- Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., and Rafailovich, M. H. (2010). Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4 (1), 120–137. doi:10.3109/17435390903471463
- Negahdary, M., Reyhaneh, C., Shahrzad, K. Z., and Marziyeh, A. (2015). The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in *in vivo* condition. *Adv. Biomed. Res.* 4 (69), 69. doi:10.4103/2277-9175.153893
- Ng, K. W., Faulkner, N., Finsterbusch, K., Wu, M., Harvey, R., Hussain, S., et al. (2022). SARS-CoV-2 S<sub>2</sub>-targeted vaccination elicits broadly neutralizing antibodies. *Sci. Transl. Med.* 14 (655), eabn3715. doi:10.1126/scitranslmed.abn3715
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., et al. (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses *in vitro* and *in vivo*. *ACS Nano* 7 (5), 3926–3938. doi:10.1021/nn3057005
- Perry, J. L., Reuter, K. G., Kai, M. P., Herlihy, K. P., Jones, S. W., Luft, J. C., et al. (2012). PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics. *Nano Lett.* 12 (10), 5304–5310. doi:10.1021/nl302638g
- Pinto, D., Sauer, M. M., Czudnochowski, N., Low, J. S., Tortorici, M. A., Housley, M. P., et al. (2021). Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody. *Science* 373 (6559), 1109–1116. doi:10.1126/science.abj3321
- Poh, C. M., Carissimo, G., Wang, B., Amrun, S. N., Lee, C.Y.-P., Chee, R.S.-L., et al. (2020). Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nat. Commun.* 11 (1), 2806. doi:10.1038/s41467-020-16638-2
- Qian, T., Li, J., Feng, W., and Nian, H. (2017). Enhanced thermal conductivity of form-stable phase change composite with single-walled carbon nanotubes for thermal energy storage. *Sci. Rep.* 7 (1), 44710. doi:10.1038/srep44710
- Raghuvanshi, D., Mishra, V., Das, D., Kaur, K., and Suresh, M. R. (2012). Dendritic cell targeted chitosan nanoparticles for nasal DNA immunization against SARS CoV nucleocapsid protein. *Mol. Pharm.* 9 (4), 946–956. doi:10.1021/mp200553x
- Rahme, K., Chen, L., Hobbs, R. G., Morris, M. A., O’Driscoll, C., and Holmes, J. D. (2013). PEGylated nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Adv.* 3 (17), 6085–6094. doi:10.1039/c3ra22739a
- Sekimukai, H., Iwata-Yoshikawa, N., Fukushi, S., Tani, H., Kataoka, M., Suzuki, T., et al. (2020). PEGylated nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. *Microbiol. Immunol.* 64 (1), 33–51. doi:10.1111/1348-0421.12754
- Shardlow, E., Mold, M., and Exley, C. (2018). Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy, Asthma and Clin. Immunol.* 14 (1), 80. doi:10.1186/s13223-018-0305-2
- Shinchi, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Cottam, H. B., et al. (2019). Gold nanoparticles coimmobilized with small molecule toll-like receptor 7 ligand and  $\alpha$ -mannose as adjuvants. *Bioconjugate Chem.* 30 (11), 2811–2821. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00560
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhone, R. R., and Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21 (23), 10644–10654. doi:10.1021/la0513712
- Tapia, D., Sanchez-Villamil, J. I., Stevenson, H. L., and Torres, A. G. (2021). Multicomponent gold-linked glycoconjugate vaccine elicits antigen-specific humoral and mixed TH1-TH17 immunity, correlated with increased protection against burkholderia pseudomallei. *MBio* 12 (3), e0122721. doi:10.1128/mbio.01227-21
- Tomić, S., Đokić, J., Vasilijević, S., Ogrinc, N., Rudolf, R., Pelicon, P., et al. (2014). Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells *in vitro*. *PLoS ONE* 9 (5), e96584. doi:10.1371/journal.pone.0096584
- Trabicc, K. R., Kleski, K. A., and Barchi, J. J. (2021). Stable gold-nanoparticle-based vaccine for the targeted delivery of tumor-associated glycopeptide antigens. *ACS Bio Med Chem Au* 1 (1), 31–43. doi:10.1021/acsbiochemau.1c00021

- U.S. Food and Drug Administration (2021). Emergency use authorization for vaccines to prevent COVID-19: guidance for industry. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/emergency-use-authorization-vaccines-prevent-covid-19> (Accessed September 15, 2023).
- Vasquez, Y., Kolle, M., Mishchenko, L., Hatton, B. D., and Aizenberg, J. (2014). Three-phase Co-assembly: *in situ* incorporation of nanoparticles into tunable, highly ordered, porous silica films. *ACS Photonics* 1 (1), 53–60. doi:10.1021/ph400067z
- Wang, C., Zhu, W., and Wang, B.-Z. (2017). Dual-linker gold nanoparticles as adjuvanting carriers for multivalent display of recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin improve the immunological responses *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Nanomedicine* 12, 4747–4762. doi:10.2147/ijn.s137222
- Wang, W., Wei, Q., Wang, J., Wang, B., Zhang, S., and Yuan, Z. (2013). Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): stabilizer or coagulant? *J. colloid interface Sci.* 404, 223–229. doi:10.1016/j.jcis.2013.04.020
- World Health Organization (2023). *WHO COVID-19 dashboard*. Geneva, Switzerland. World Health Organization. Available at: <https://covid19.who.int/> (Accessed September 15, 2023).
- Xu, X., Gan, M., Ge, Y., Cheng, Y., Feng, T., Liu, M., et al. (2021). Multifaceted glycoadjuvant@AuNPs inhibits tumor metastasis through promoting T cell activation and remodeling tumor microenvironment. *J. Nanobiotechnology* 19 (1), 376. doi:10.1186/s12951-021-01129-3
- Zhang, X. (2015). Gold nanoparticles: recent advances in the biomedical applications. *Cell Biochem. Biophysics* 72 (3), 771–775. doi:10.1007/s12013-015-0529-4
- Zhou, Q., Zhang, Y., Du, J., Li, Y., Zhou, Y., Fu, Q., et al. (2016). Different-sized gold nanoparticle activator/antigen increases dendritic cells accumulation in liver-draining lymph nodes and CD8+ T cell responses. *ACS Nano* 10 (2), 2678–2692. doi:10.1021/acsnano.5b07716

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadyani, R., Ahmadyani, H., Moradi, M., Moradi, S., Shahlaei, M., Zahabi, S. S., Aghaz, F., Moloudi, K., & Farhadian, N. (2024). One-pot hydrothermal synthesise and characterization of Au/Gd bimetallic nanostructure as potential contrast agents in CT and MR imaging. *BioImpacts*, *15*(1), 30459–30459. <https://doi.org/10.34172/BI.30459>
- Almeida, J. P. M., Lin, A. Y., Figueroa, E. R., Foster, A. E., & Drezek, R. A. (2015). In vivo gold nanoparticle delivery of peptide vaccine induces anti-tumor immune response in prophylactic and therapeutic tumor models. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), *11*(12), 1453–1459. <https://doi.org/10.1002/sml.201402179>
- Alobaid, M. A., Richards, S. J., Alexander, M. R., Gibson, M. I., & Ghaemmaghami, A. M. (2024). Monosaccharide coating modulate the intracellular trafficking of gold nanoparticles in dendritic cells. *Materials Today Bio*, *29*, 101371. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2024.101371>
- Anik, M. I., Mahmud, N., Masud, A. Al, & Hasan, M. (2022). Gold nanoparticles (GNPs) in biomedical and clinical applications: A review. *Nano Select*, *3*(4), 792–828. <https://doi.org/10.1002/NANO.202100255>
- Appidi, T., China, D., Ştefan, G. R., Moreau, M., Mao, S., Velarde, E., Toyang, N., Lowe, H., Rengan, A. K., Ding, K., & Ngwa, W. (2025). Engineered multifunctional nanoparticles for enhanced radiation therapy: three-in-one approach for cancer treatment. *Molecular Cancer*, *24*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12943-025-02266-1/FIGURES/8>
- Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S. A., Rouphael, N., Creech, C. B., McGettigan, J., Khetan, S., Segall, N., Solis, J., Brosz, A., Fierro, C., Schwartz, H., Neuzil, K., Corey, L., ... Zaks, T. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, *384*(5), 403–416. [https://doi.org/10.1056/NEJM0A2035389/SUPPL\\_FILE/NEJM0A2035389\\_DATA-SHARING.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJM0A2035389/SUPPL_FILE/NEJM0A2035389_DATA-SHARING.PDF)
- Baker, S. R., Bloom, N., Davis, S. J., Kost, K., Sammon, M., & Viratyosin, T. (2020). The Unprecedented Stock Market Reaction to COVID-19. *The Review of Asset Pricing Studies*, *10*(4), 742–758. <https://doi.org/10.1093/RAPSTU/RAAA008>
- Bartczak, D., & Kanaras, A. G. (2011). Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, *27*(16), 10119–10123. <https://doi.org/10.1021/la2022177>
- Behrendt, R., White, P., & Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, *22*(1), 4–27. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>
- Bodanszky, M., & Bodanszky, A. (1984). *The practice of peptide synthesis*. Springer-Verlag.
- Britton, A., Embi, P. J., Levy, M. E., Gaglani, M., DeSilva, M. B., Dixon, B. E., Dascomb, K., Patel, P., Schrader, K. E., Klein, N. P., Ong, T. C., Natarajan, K., Hartmann, E., Kharbanda, A. B., Irving, S. A., Dickerson, M., Dunne, M. M., Raiyani, C., Grannis, S. J., ... Tenforde, M. W. (2022). Effectiveness of COVID-19 mRNA Vaccines Against COVID-19–Associated Hospitalizations Among Immunocompromised Adults During SARS-CoV-2 Omicron Predominance — VISION Network, 10 States, December 2021—August 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *71*(42), 1335–1342. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM7142A4>
- Brown, T. L., & Lemay, H. E. (1985). *Chemistry: The Central Science*. (N. J. Prentice Hall Inc, Englewood, Ed.; 3rd ed.).

- Callaway, E. (2020). The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature*, 580(7805), 576–577. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01221-y>
- Cassani, M., Fernandes, S., Pagliari, S., Cavalieri, F., Caruso, F., & Forte, G. (2025). Unraveling the Role of the Tumor Extracellular Matrix to Inform Nanoparticle Design for Nanomedicine. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 12(2), e2409898. <https://doi.org/10.1002/advs.202409898>
- Chauhan, A., Khan, T., & Omri, A. (2021). Design and Encapsulation of Immunomodulators onto Gold Nanoparticles in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/IJMS22158037>
- Chung, J. Y., Thone, M. N., & Kwon, Y. J. (2021). COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 170, pp. 1–25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011>
- Climent, N., García, I., Marradi, M., Chiodo, F., Miralles, L., Maleno, M. J., Gatell, J. M., García, F., Penadés, S., & Plana, M. (2018). Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.009>
- ClinicalTrials.gov. (2024). A Phase-I study of a nanoparticle-based peptide vaccine against SARS-CoV-2 (NCT05605987)
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, 5, 63. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- CoVariants. (2020). *CoVariants 2022*. CoVariants. <https://covariants.org/>
- COVAX. (n.d.). Retrieved March 25, 2025, from <https://www.who.int/initiatives/act-accelerator/covax>
- Dai, L., & Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews. Immunology*, 21(2), 73–82. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-00480-0>
- Delamater, P. L., Street, E. J., Leslie, T. F., Yang, Y. T., & Jacobsen, K. H. (2019). Complexity of the basic reproduction number ( $R_0$ ). *Emerging Infectious Diseases*, 25(1), 1–4. <https://doi.org/10.3201/eid2501.171901>
- Dykman, L. A., & Khlebtsov, N. G. (2017). *Immunological properties of gold nanoparticles*. <https://doi.org/10.1039/c6sc03631g>
- Dykman, L. A., Staroverov, S. A., Fomin, A. S., Khanadeev, V. A., Khlebtsov, B. N., & Bogatyrev, V. A. (2018). Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production. *International Immunopharmacology*, 54(June 2017), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.008>
- Dykman, L., & Khlebtsov, N. (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/C1CS15166E>
- Est-Witte, S. E., Livingston, N. K., Omotoso, M. O., Green, J. J., & Schneck, J. P. (2021). Nanoparticles for generating antigen-specific T cells for immunotherapy. *Seminars in Immunology*, 56, 101541. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2021.101541>

- European Medicines Agency. (2021). *Regulatory requirements for vaccines intended to provide protection against variant strain(s) of SARS-CoV-2*. <https://www.ema.europa.eu/en/regulatory-requirements-vaccines-intended-provide-protection-against-variant-strains-sars-cov-2>
- Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D. D. 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 (New York, N.Y.)*, *372*(6544). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABH2644>
- Favi, P. M., Gao, M., Johana Sepúlveda Arango, L., Ospina, S. P., Morales, M., Pavon, J. J., & Webster, T. J. (2015). Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *103*(11), 3449–3462. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35491>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, *382*(18), 1708–1720. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA2002032/SUPPL\\_FILE/NEJMOA2002032\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA2002032/SUPPL_FILE/NEJMOA2002032_DISCLOSURES.PDF)
- Guo, W., Duan, K., Zhang, Y., Yuan, Z., Zhang, Y. B., Wang, Z., Zhao, D., Zhang, H., Xie, Z., Li, X., Peng, C., Zhang, W., Yang, Y., Chen, W., Gao, X., You, W., Wang, X. W., Shi, Z., Wang, Y., ... Yang, X. (2021). Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *EClinicalMedicine*, *38*. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101010>
- Gupta, R., & Rai, B. (2017). Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45292>
- Hameed, M. K., Gul, M. T., Khan, A. A., Kanu, G. A., AbuOdeh, R. O., Kim, S., Han, C., & Mohamed, A. A. (2025). Enhanced delivery of doxorubicin via transferrin-coated arylated gold nanostars for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, *673*. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2025.125418>
- Heath, P. T., Galiza, E. P., Baxter, D. N., Boffito, M., Browne, D., Burns, F., Chadwick, D. R., Clark, R., Cosgrove, C., Galloway, J., Goodman, A. L., Heer, A., Higham, A., Iyengar, S., Jamal, A., Jeanes, C., Kalra, P. A., Kyriakidou, C., McAuley, D. F., ... Toback, S. (2021). Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *The New England Journal of Medicine*, *385*(13), 1172–1183. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2107659>
- 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/ASSET/D8A79F2A-7212-4EF2-A6B9-2711A8B10958/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>
- Horwitz, D. A., Bickerton, S., & La Cava, A. (2021). Strategies to Use Nanoparticles to Generate CD4 and CD8 Regulatory T Cells for the Treatment of SLE and Other Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.681062>

- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2010.02.002>
- Huergo, M. A., Schuknecht, F., Zhang, J., & Lohmüller, T. (2022). Plasmonic Nanoagents in Biophysics and Biomedicine. *Advanced Optical Materials*, 10(14), 2200572. <https://doi.org/10.1002/ADOM.202200572>
- Hussain, S.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Murdock, R.C., Yu, K.O., Mattie, D.M., Schlager, J.J. and Terrones, M. (2009), Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges. *Adv. Mater.*, 21: 1549-1559. <https://doi.org/10.1002/adma.200801395>
- Johnson, P. B., & Christy, R. W. (1972). Optical Constant of the Nobel Metals. *Physical Review B*, 6(12), 4370–4379.
- Kang, Y.-F., Sun, C., Zhuang, Z., Yuan, R.-Y., Zheng, Q., Li, J.-P., Zhou, P.-P., Chen, X.-C., Liu, Z., Zhang, X., Yu, X.-H., Kong, X.-W., Zhu, Q.-Y., Zhong, Q., Xu, M., Zhong, N.-S., Zeng, Y.-X., Feng, G.-K., Ke, C., ... Zeng, M.-S. (2021). Rapid Development of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Candidates. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08379>
- Kang, B., Mackey, M. A., & El-Sayed, M. A. (2010). Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), 1517–1519. <https://doi.org/10.1021/ja9102698>
- 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>
- Krishnamoorthy, S., Swain, B., Verma, R. S., & Gunthe, S. S. (2020). SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV viruses: an overview of origin, evolution, and genetic variations. *VirusDisease*, 31(4), 411–423. <https://doi.org/10.1007/s13337-020-00632-9>
- Kuipers, B. J., & Gruppen, H. (2007). Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5445–5451. <https://doi.org/10.1021/jf070337l>
- Li, Y., Jin, Q., Ding, P., Zhou, W., Chai, Y., Li, X., Wang, Y., & Zhang, G. (2020a). Gold nanoparticles enhance immune responses in mice against recombinant classical swine fever virus E2 protein. *Biotechnology Letters*, 42(7), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02853-w>
- Li, Y., Jin, Q., Ding, P., Zhou, W., Chai, Y., Li, X., Wang, Y., & Zhang, G. (2020b). Gold nanoparticles enhance immune responses in mice against recombinant classical swine fever virus E2 protein. *Biotechnology Letters*, 42(7), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-02853-W>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(40), 8410–8426. <https://doi.org/10.1021/jp9917648>

- Liu, Y., Wang, Z., Yu, F., Li, M., Zhu, H., Wang, K., Meng, M., & Zhao, W. (2021). The adjuvant of  $\alpha$ -galactosylceramide presented by gold nanoparticles enhances antitumor immune responses of MUC1 antigen-based tumor vaccines. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 403–420. <https://doi.org/10.2147/IJN.S273883>
- McLean, G., Kamil, J., Lee, B., Moore, P., Schulz, T. F., Muik, A., Sahin, U., Türeci, Ö., & Pather, S. (2022). The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. *MBio*, *13*(2). [https://doi.org/10.1128/MBIO.02979-21/SUPPL\\_FILE/MBIO.02979-21-S0003.DOCX](https://doi.org/10.1128/MBIO.02979-21/SUPPL_FILE/MBIO.02979-21-S0003.DOCX)
- Meng, Y., Chen, C., Lin, R., Zheng, L., Fan, Y., Zhang, M., Zhang, Z., Shi, H., Zheng, X., Chen, J., Chen, D., Teng, T., & Chen, B. (2024). Mitochondria-Targeting Virus-Like Gold Nanoparticles Enhance Chemopreventive Efficacy Against Pancreatic Cancer in a Xenograft Mouse Model. *International Journal of Nanomedicine*, *19*, 14059–14074. <https://doi.org/10.2147/IJN.S497346>
- Merrifield R. B. (1969). Solid-phase peptide synthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, *32*, 221–296. <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch6>
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, *37*(5), 790–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>
- Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., & Rafailovich, M. H. (2010). Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, *4*(1), 120–137. <https://doi.org/10.3109/17435390903471463>
- Ng, K. W., Faulkner, N., Finsterbusch, K., Wu, M., Harvey, R., Hussain, S., Greco, M., Liu, Y., Kjaer, S., Swanton, C., Gandhi, S., Beale, R., Gamblin, S. J., Cherepanov, P., McCauley, J., Daniels, R., Howell, M., Arase, H., Wack, A., ... Kassiotis, G. (2022). SARS-CoV-2 S2-targeted vaccination elicits broadly neutralizing antibodies. *Science Translational Medicine*, *14*(655), 3715. [https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABN3715/SUPPL\\_FILE/SCITRANSLMED.ABN3715\\_DATA\\_FILE\\_S1.ZIP](https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABN3715/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ABN3715_DATA_FILE_S1.ZIP)
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., Ijiro, K., & Sawa, H. (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*, *7*(5), 3926–3938. <https://doi.org/10.1021/nn3057005>
- Niu, J., Chu, Y., Huang, Y. F., Chong, Y. S., Jiang, Z. H., Mao, Z. W., Peng, L. H., & Gao, J. Q. (2017). Transdermal Gene Delivery by Functional Peptide-Conjugated Cationic Gold Nanoparticle Reverses the Progression and Metastasis of Cutaneous Melanoma. *ACS applied materials & interfaces*, *9*(11), 9388–9401. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16378>
- Oh, E., Delehanty, J. B., Sapsford, K. E., Susumu, K., Goswami, R., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., Granek, J., Shoff, M., Zhang, Q., Goering, P. L., Huston, A., & Medintz, I. L. (2011). Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size. *ACS Nano*, *5*(8), 6434–6448. <https://doi.org/10.1021/nn201624c>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Coronavirus disease (COVID-19): Variants of SARS-CoV-2. Recuperado de [who.int](http://who.int)

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Statement on the update of WHO's working definitions and tracking system for SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest. Recuperado de who.int
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2024). COVID-19 variants | WHO COVID-19 dashboard. Recuperado de datadot
- Peiris, J. S. M., Guan, Y., & Yuen, K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine* 2004 10:12, 10(12), S88–S97. <https://doi.org/10.1038/nm1143>
- Perry, J. L., Reuter, K. G., Kai, M. p., Herlihy, K. P., Jones, S. W., Luft, J. C., Napier, M., Bear, J. E., & DeSimone, J. M. (2012). PEGylated PRINT Nanoparticles: The Impact of PEG Density on Protein Binding, Macrophage Association, Biodistribution, and Pharmacokinetics. *Nano Letters*, 12(10), 5304–5310. <https://doi.org/10.1021/nl302638g>
- Poh, C. M., Carissimo, G., Wang, B., Amrun, S. N., Lee, C. Y. P., Chee, R. S. L., Fong, S. W., Yeo, N. K. W., Lee, W. H., Torres-Ruesta, A., Leo, Y. S., Chen, M. I. C., Tan, S. Y., Chai, L. Y. A., Kalimuddin, S., Kheng, S. S. G., Thien, S. Y., Young, B. E., Lye, D. C., ... Ng, L. F. P. (2020). Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients. *Nature Communications*, 11(2806). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16638-2>
- 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/SUPPL\\_FILE/NEJMOA2034577\\_DATA-SHARING.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA2034577/SUPPL_FILE/NEJMOA2034577_DATA-SHARING.PDF)
- Raghuwanshi, D., Mishra, V., Das, D., Kaur, K., & Suresh, M. R. (2012). Dendritic cell targeted chitosan nanoparticles for nasal DNA immunization against SARS CoV nucleocapsid protein. *Molecular Pharmaceutics*, 9(4), 946–956. <https://doi.org/10.1021/mp200553x>
- Rahme, K., Chen, L., Hobbs, R. G., Morris, M. A., O'Driscoll, C., & Holmes, J. D. (2013). PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Advances*, 3(17), 6085–6094. <https://doi.org/10.1039/c3ra22739a>
- Ranney, M. L., Griffith, V., & Jha, A. K. (2020). Critical Supply Shortages — The Need for Ventilators and Personal Protective Equipment during the Covid-19 Pandemic. *New England Journal of Medicine*, 382(18). [https://doi.org/10.1056/NEJMP2006141/SUPPL\\_FILE/NEJMP2006141\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMP2006141/SUPPL_FILE/NEJMP2006141_DISCLOSURES.PDF)
- Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, Danscher G. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 2007 Oct 19;4:10. doi: 10.1186/1743-8977-4-10. PMID: 17949501; PMCID: PMC2146996.
- Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A., Cárdenas, V., Shukarev, G., Grinsztejn, B., Goepfert, P. A., Truyers, C., Fennema, H., Spiessens, B., Offergeld, K., Scheper, G., Taylor, K. L., Robb, M. L., Treanor, J., Barouch, D. H., Stoddard, J., Ryser, M. F., Marovich, M. A., ... Douoguih, M. (2021). Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COVS.2 Vaccine against Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(23), 2187–2201. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA2101544/SUPPL\\_FILE/NEJMOA2101544\\_DATA-SHARING.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA2101544/SUPPL_FILE/NEJMOA2101544_DATA-SHARING.PDF)

- Sakono, N., Nakamura, K., Oshima, T., Hayakawa, R., & Sakono, M. (2019). Tyrosinase-mediated peptide conjugation with chitosan-coated gold nanoparticles. *Analytical Sciences*, 35(1), 79–83. <https://doi.org/10.2116/analsci.18SDP03>
- Salazar, V. A., Comenge, J., Suárez-López, R., Burger, J. A., Sanders, R. W., Bastús, N. G., Jaime, C., Joseph-Munne, J., & Puentes, V. (2024). Gold Nanoparticle Virus-like Particles Presenting SARS-CoV-2 Spike Protein: Synthesis, Biophysical Properties and Immunogenicity in BALB/c Mice. *Vaccines*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/VACCINES12080829/S1>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shinchi, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Cottam, H. B., Hayashi, T., Carson, D. A., & Suda, Y. (2019). Gold Nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and  $\alpha$ -Mannose as Adjuvants. *Bioconjugate Chemistry*, 30(11), 2811–2821. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00560>
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*, 21(23), 10644–10654. <https://doi.org/10.1021/la0513712>
- Slaoui, M., & Hepburn, M. (2020). Developing Safe and Effective Covid Vaccines — Operation Warp Speed’s Strategy and Approach. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1701–1703. [https://doi.org/10.1056/NEJMP2027405/SUPPL\\_FILE/NEJMP2027405\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMP2027405/SUPPL_FILE/NEJMP2027405_DISCLOSURES.PDF)
- Sonavane, G., Tomoda, K., & Makino, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 66(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.004>
- Tapia, D., Sanchez-Villamil, J. I., Stevenson, H. L., & Torres, A. G. (2021). Multicomponent gold-linked glycoconjugate vaccine elicits antigen-specific humoral and mixed th1-th17 immunity, correlated with increased protection against burkholderia pseudomallei. *MBio*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01227-21>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., Gottberg, A. von, Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Zyl, G. Van, ... Oliveira, T. de. (2020). Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *MedRxiv*, 10, 2020.12.21.20248640. <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>
- Thakur, S. S., & Sharma, B. P. (2024). Cancer Imaging Enhancement through Nanotechnology. *Nanoparticles in Cancer Theranostics: Current Progress in Cancer Management*, 123–152. <https://doi.org/10.1201/9781003463191-9/CANCER-IMAGING-ENHANCEMENT-NANOTECHNOLOGY-SAMJEET-SINGH-THAKUR-BHAGWATI-PRASHAD-SHARMA>
- Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2011). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials 2011, Vol. 1, Pages 31-63*, 1(1), 31–63. <https://doi.org/10.3390/NANO1010031>
- Tomic, S., Đokic, J., Vasilijic, S., Ogrinc, N., Rudolf, R., Pelicon, P., VučevićVučević, D., Milosavljevic, P., -a Jankovic, S., Anž el, I., Rajkovic, J., Slak Rupnik, M., Friedrich, B., & ˘ olic, M. C. (2014). Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. *PLoS ONE*, 9(5), 96584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>

- Trabbic, K. R., Kleski, K. A., & Barchi, J. J. (2021). Stable Gold-Nanoparticle-Based Vaccine for the Targeted Delivery of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens. *ACS Bio & Med Chem Au*, 1(1), 31–43. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.1c00021>
- U.S. Food and Drug Administration. (2021). *Emergency use authorization for vaccines to prevent COVID-19: guidance for industry*. FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/emergency-use-authorization-vaccines-prevent-covid-19>
- Vasquez, Y., Kolle, M., Mishchenko, L., Hatton, B. D., & Aizenberg, J. (2014). Three-Phase Co-assembly: In Situ Incorporation of Nanoparticles into Tunable, Highly Ordered, Porous Silica Films. *ACS Photonics*, 1(1), 53–60.
- Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Frontiers in Chemistry*, 7(APR), 167. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00167>
- 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., Borat, 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)
- Wang, C., Zhu, W., & Wang, B. Z. (2017). Dual-linker gold nanoparticles as adjuvanting carriers for multivalent display of recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin improve the immunological responses in vivo and in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4747–4762. <https://doi.org/10.2147/IJN.S137222>
- 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* 2021 593:7857, 593(7857), 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Wang, W., Wei, Q. Q., Wang, J., Wang, B. C., Zhang, S. hui, & Yuan, Z. (2013). Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? *Journal of Colloid and Interface Science*, 404, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.020>
- World Health Organization. (2020). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*. <https://covid19.who.int/>
- Wu, J. T., Leung, K., Bushman, M., Kishore, N., Niehus, R., de Salazar, P. M., Cowling, B. J., Lipsitch, M., & Leung, G. M. (2020). Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nature Medicine* 2020 26:4, 26(4), 506–510. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
- Xia, H., Bai, S., Hartmann, J., & Wang, D. (2009). Synthesis of Monodisperse Quasi-Spherical Gold Nanoparticles in Water via Silver(I)-Assisted Citrate Reduction. *Langmuir*, 26(5), 3585-3589. <https://doi.org/10.1021/la902987w>
- Xu, Z., Wang, X., & Zhang, L. (2015). Effect of peptide length on the conjugation to the gold nanoparticle surface: A molecular dynamic study. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40199-014-0085-2>

- Yafout, M., Ousaid, A., Khayati, Y., & El Otmani, I. S. (2021). Gold nanoparticles as a drug delivery system for standard chemotherapeutics: A new lead for targeted pharmacological cancer treatments. *Scientific African*, 11, e00685. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00685>
- 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/SUPPL\\_FILE/ABB2762S1.MP4](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB2762/SUPPL_FILE/ABB2762S1.MP4)
- You, X. (2024). Functionalized gold nanoparticles serve as nanovaccine to boost Immune protection for cancer. *Theoretical and Natural Science*, 64(1), 8–17. <https://doi.org/10.54254/2753-8818/64/20241550>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Fan, F. Y., & Fan, S. J. (2012). In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. *Biomaterials*, 33(18), 4628–4638. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.020>
- Zhao, J., He, J., Ding, X., Zhou, Y., Liu, M., Chen, X., Quan, W., Hua, D., Tong, J., & Li, J. (2024). DENV Peptides Delivered as Spherical Nucleic Acid Constructs Enhance Antigen Presentation and Immunogenicity in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 19, 9757–9770. <https://doi.org/10.2147/IJN.S467427>
- 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* 2020 579:7798, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, Q., Zhang, Y., Du, J., Li, Y., Zhou, Y., Fu, Q., Zhang, J., Wang, X., & Zhan, L. (2016). Different-Sized Gold Nanoparticle Activator/Antigen Increases Dendritic Cells Accumulation in Liver-Draining Lymph Nodes and CD8+ T Cell Responses. *ACS Nano*, 10(2), 2678–2692. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07716>
- Zhu, F., Cao, Y., Xu, S., & Zhou, M. (2020). Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV in a patient in Wuhan city, China. *Journal of Medical Virology*, 92(6), 529–530. <https://doi.org/10.1002/JMV.25732>
- R. Zirbs et al., Melt-grafting for the synthesis of core-shell nanoparticles with ultra-high dispersant density, *Nanoscale*, 2015, 7 , 11216 —11225