

Expresión y purificación de un antígeno vacunal contra SARS-CoV-2 variante Delta

Zuriel Eduardo Martínez Valencia, Leandro Alberto Núñez Muñoz, Berenice Calderón Pérez, Roberto Ruiz Medrano, Beatriz Xoconostle Cázares. Contacto - bxoconos@cinvestav.mx

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Zacatenco

Palabras clave: Antígeno Vacunal, SARS-CoV-2, Variante Delta

Reunión 9 de junio 2022 Contraseña: 1SUVQV

Resumen

Los coronavirus SARS-CoV y SARS-CoV-2 emplean al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 para ingresar a las células humanas mediante la interacción con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). La variante de preocupación (VOC) Delta (B.1.617.2) del virus causante de COVID-19 tiene cambios a nivel de secuencia en el RBD que le permite cambiar su afinidad por el receptor ACE2. A pesar de que la vacunación ha demostrado protección cruzada, sigue siendo relevante la obtención de un antígeno vacunal específico contra la VOC Delta debido a su alta infectividad y transmisibilidad. Por ello, en el presente trabajo se diseñó un antígeno vacunal no glicosilado con base en el dominio RBD de esta VOC. Se presentan los resultados de la expresión heteróloga en *E. coli*, la producción y purificación cromatográfica, así como de ensayos de inmunogenicidad cruzada tanto en sueros de ratón Balb/c inmunizados previamente con un antígeno de las variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) y Wuhan (Wuhan-Hu-1), como en suero de pacientes post COVID infectados con la variante Wuhan-Hu-1.

Introducción

El coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), emplea al dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína *Spike* (S) para ingresar a las células humanas mediante la interacción con la enzima convertidora de angiotensina (ACE2)¹. Actualmente se conocen diferentes variantes de preocupación (VOC) del SARS-CoV-2², entre las que se encuentra Delta (B.1.617.2) con cambios a nivel de la secuencia del RBD que le permite modificar su afinidad por el receptor humano ACE2. A pesar de que la vacunación ha demostrado protección cruzada, sigue siendo relevante la obtención de un antígeno vacunal específico contra la variante Delta debido a su alta infectividad y transmisibilidad. Por lo anterior, el principal objetivo de este trabajo fue el diseño y producción de un antígeno vacunal no glicosilado con base en el RBD de Delta, debido a que se ha descrito que las regiones proteicas sin residuos glicosilados son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes³. El péptido recombinante incluyó la región S371-F541 de la proteína S con las modificaciones en L452R y T478K en la secuencia del RBD. Se presentan los resultados del diseño, producción y estandarización de las condiciones de purificación mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad por intercambio catiónico y aniónico. Se optimizó la formulación del antígeno vacunal y se realizaron ensayos de inmunogenicidad cruzada con sueros preinmunes e inmunizados del modelo murino Balb/c, así como con sueros humanos preinmunes y convalescentes de Wuhan-Hu-1. El desarrollo de antígenos vacunales para la variante Delta permitirá mitigar el impacto del virus SARS-CoV-2 en la salud humana y limitará su evolución a formas más contagiosas y agresivas.

Objetivos

- Obtener un antígeno vacunal eficaz para SARS-CoV-2.
- Evaluar solubilidad y estabilidad del antígeno vacunal.
- Evaluación inmunogénica mediante ensayos Elisa.

Metodología

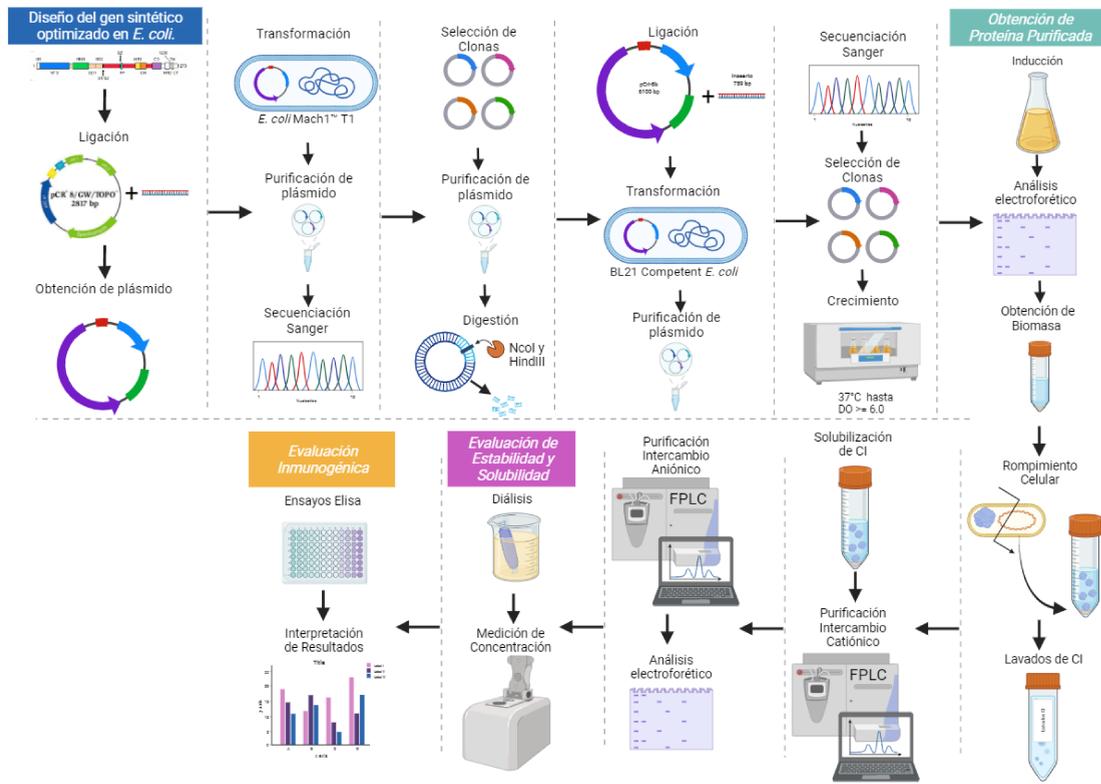


Fig 1. Metodología realizada para obtener el antígeno vacunal para SARS-CoV-2. CI: Cuerpos de inclusión.

Resultados

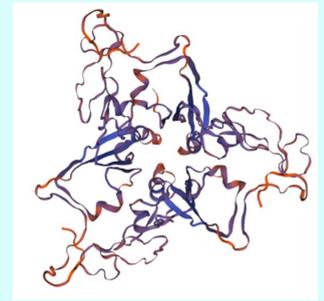


Fig 2. Modelado del antígeno vacunal mediante el programa Expasy, con un tamaño de 20.1 kDa.

Secuencia	Posición
S2A TACGTTACCGCGTGTTCGCAAAAGCAACCTGAAACCGTTGAAACGCGACATCAGCACC	300
S1B TACGTTACCGCGTGTTCGCAAAAGCAACCTGAAACCGTTGAAACGCGACATCAGCACC	300
S2B TACGTTACCGCGTGTTCGCAAAAGCAACCTGAAACCGTTGAAACGCGACATCAGCACC	300
S1A TACGTTACCGCGTGTTCGCAAAAGCAACCTGAAACCGTTGAAACGCGACATCAGCACC	300
gRRR: TACGTTACCGCGTGTTCGCAAAAGCAACCTGAAACCGTTGAAACGCGACATCAGCACC	300
S2A GAAATTTACAGCCCGGTTCTAAACDGTGTAAACCGGTTGAAAGTTTAACTGCTACTTT	360
S1B GAAATTTACAGCCCGGTTCTAAACDGTGTAAACCGGTTGAAAGTTTAACTGCTACTTT	360
S2B GAAATTTACAGCCCGGTTCTAAACDGTGTAAACCGGTTGAAAGTTTAACTGCTACTTT	360
S1A GAAATTTACAGCCCGGTTCTAAACDGTGTAAACCGGTTGAAAGTTTAACTGCTACTTT	360
gRRR: GAAATTTACAGCCCGGTTCTAAACDGTGTAAACCGGTTGAAAGTTTAACTGCTACTTT	360
S2A CCGCTCAGAGCTACGGTTTTACGCGACCAACCGCGTAGGTTATCACCGTATCGCGTT	420
S1B CCGCTCAGAGCTACGGTTTTACGCGACCAACCGCGTAGGTTATCACCGTATCGCGTT	420
S2B CCGCTCAGAGCTACGGTTTTACGCGACCAACCGCGTAGGTTATCACCGTATCGCGTT	420
S1A CCGCTCAGAGCTACGGTTTTACGCGACCAACCGCGTAGGTTATCACCGTATCGCGTT	420
gRRR: CCGCTCAGAGCTACGGTTTTACGCGACCAACCGCGTAGGTTATCACCGTATCGCGTT	420

Fig 3. Análisis bioinformático mediante Clustal Omega. Comparación la secuencia del RBD de Wuhan-Hu1 con Delta.

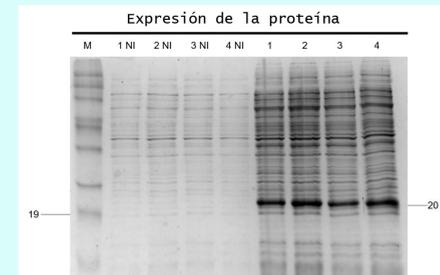


Fig 4. Análisis electroforético de la inducción del antígeno Delta después de 16 h de crecimiento a 16°C. M = marcador, #NI = colonias no inducidas, #(1-4) = colonias inducidas.

Evaluación inmunogénica de Sueros de Ratón Inmunizados

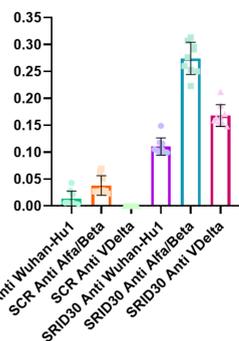


Fig 7. Análisis de la evaluación inmunogénica de sueros de ratón Balb/c control y de ratón Balb/c inmunizados. SCR = sueros control de ratón, SRID30 = sueros de ratón inmunizados al día 30.

Evaluación inmunogénica de Sueros Humanos

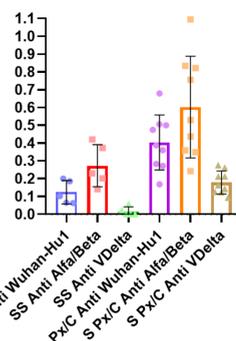


Fig 6. Análisis de la evaluación inmunogénica de sueros de humanos sanos y de pacientes convalescentes de COVID-19. SS = sueros sanos, S PxC = sueros de pacientes convalescentes.

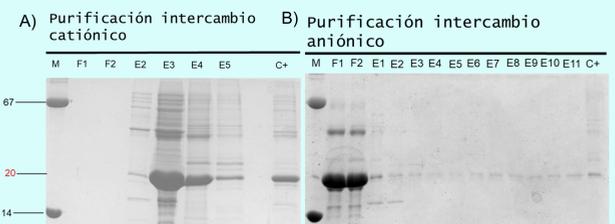


Fig 5. Análisis electroforético de la purificación por FPLC en A) la purificación de intercambio catiónico se observa el antígeno en las fracciones E3 y E4, en B) la purificación de intercambio aniónico se observa el antígeno purificado en las fracciones F1 y F2. F = frentes, E = eluciones, M = marcador, C+ = control positivo.

Conclusiones

En el presente trabajo se clonó un gen sintético que codifica para el subdominio RBD de la variante de preocupación Delta, empleando el uso preferencial de codones de *E. coli*. La expresión optimizada del antígeno fue mejor a 16°C, donde se obtiene la proteína de interés en los cuerpos de inclusión. La proteína fue solubilizada y purificada en cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad, empleando resinas de intercambio catiónico e iónico. El antígeno se replegó y se evaluó su inmunogenicidad a través de su detección por ensayos tipo ELISA, empleando sueros de ratones inmunizados con el dominio RBD de Wuhan, y Alfa-Beta, donde se demostró la capacidad de detección cruzada de los sueros hiperinmunes. La detección del antígeno por pacientes recuperados de COVID demostró que también hay una reacción cruzada, sugiriendo una protección parcial contra la variante de preocupación Delta.

Bibliografía

- Li, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature 2003, 426, 450.
- Organización Mundial de la Salud, (22 de Febrero de 2022). Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. Recuperado el 28 de Abril de 2022 de <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
- Walls, et al., Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell 2020, 181, 281.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por AMEXCID-SRE (AMEXID/2021-1) y AMEXCID México-Uruguay. ZEMV es becario de CONACYT (780185).