

[Celda](#). 5 de agosto de 2021; 184(16): 4203–4219.e32.

Publicado en línea 2021 Jun 18. doi: [10.1016/j.cell.2021.06.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.021)

PMCID: PMC8232969

PMID: [34242577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34242577/)

Funciones *in vitro* e *in vivo* de los anticuerpos potenciadores y neutralizantes de la infección por SARS-CoV-2

[Dapeng Li](#),^{1,2,15} [Robert J. Edwards](#),^{1,2,15} [Kartik Manne](#),^{1,2,15} [David R. Martínez](#),^{3,15} [Alexandra Schäfer](#),^{3,15} [S. Munir Alam](#),^{1,2} [Kevin Wiehe](#),^{1,2} [Xiaozhi Lu](#),^{1,2} [Robert Parques](#),^{1,2} [Laura L. Sutherland](#),^{1,2} [Thomas H. Oguin, III](#),^{1,2} [Charlene McDaniel](#),⁴ [Lautaro G. Pérez](#),⁴ [Katayoun Mansourj](#),^{1,2} [Sophie M.C. Gobeil](#),^{1,2} [Katarzyna Janowska](#),^{1,2} [Victoria Stalls](#),^{1,2} [Megan Kopp](#),^{1,2} [Fangping Cai](#),^{1,2} [Esther Lee](#),^{1,2} [Andrew Foulger](#),^{1,2} [Giovanna E. Hernández](#),^{1,2} [Aja Sanzone](#),^{1,2} [Kedamawit Tilahun](#),^{1,2} [Chuancang Jiang](#),^{1,2} [Longping V. Tse](#),³ [Kevin W. Bock](#),⁵ [Mahnaz Minaj](#),⁵ [Bianca M. Nagata](#),⁵ [Kenneth Cronin](#),^{1,2} [Victoria Gee-Lai](#),^{1,2} [Margaret Deyton](#),^{1,2} [Maggie Barr](#),^{1,2} [Tarra von Holle](#),^{1,2} [Andrew N. Macintyre](#),^{1,2} [Erica Stover](#),^{1,2} [Jared Feldman](#),⁶ [Blake M. Hauser](#),⁶ [Timoteo M. Caradonna](#),⁶ [Trevor D. Scobey](#),³ [Wes Rountree](#),^{1,2} [Yunfei Wang](#),^{1,2} [M. Anthony Moody](#),^{1,7} [Derek W. Cain](#),^{1,2} [C. Todd DeMarco](#),^{1,2} [Thomas N. Denny](#),^{1,2} [Christopher W. Woods](#),^{1,2,8} [Elizabeth W. Petzold](#),⁸ [Aaron G. Schmidt](#),^{6,9} [J-Ting Teng](#),¹⁰ [Tongqing Zhou](#),¹⁰ [Peter D. Kwong](#),^{10,11} [John R. Mascola](#),¹⁰ [Barney S. Graham](#),¹⁰ [Ian N. Moore](#),⁵ [Robert Seder](#),¹⁰ [Hanne Andersen](#),¹² [Mark G. Lewis](#),¹² [David C. Montefiori](#),⁴ [Gregory D. Sempowski](#),^{1,2} [Ralph S. Baric](#),³ [Priyamvada Acharya](#),^{1,4} [Barton F. Haynes](#),^{1,2,13,*} y [Kevin O. Saunders](#)^{1,4,13,14,16,**}

[Información del autor](#) [Notas del artículo](#) [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descargo de responsabilidad](#)

Este artículo ha sido [citado por](#) otros artículos en PMC.

Datos asociados

[Materiales complementarios](#)

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

Abstracto

Resumen gráfico

Vete a:

Introducción

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ha causado una pandemia mundial con más de 157 millones de casos y 3 millones de muertes (<https://coronavirus.jhu.edu>). Si bien la solución definitiva para controlar la pandemia de COVID-19 es una vacuna segura y efectiva, neutralizar la profilaxis o el tratamiento de la infección por Ab (NAb) puede ayudar a controlar la pandemia (Graham, 2020; Sempowski et al., 2020). Uso profiláctico o terapéutico de los NAb del SARS-CoV-2 en primates no humanos (Baum et al., 2020a; Jones et al., 2020; Zost et al., 2020a) o modelos de roedores (Hassan et al., 2020; Rogers et al., 2020; Wu et al., 2020) han protegido contra la infección por SARS-CoV-2. Los potentes NAb del SARS-CoV-2 notificados hasta la fecha se dirigen predominantemente a la región de RBD (Baum et al., 2020b; Brouwer et al., 2020; Cao et al., 2020; Hansen et al., 2020; Ju et al., 2020; Liu et al., 2020a; Pinto et al., 2020; Robbani et al., 2020; Rogers et al., 2020; Shi et al., 2020; Wrapp et al., 2020a; Wu et al., 2020). Por el contrario, la neutralización de los anticuerpos NTD (Abs) del SARS-CoV-2 exhibe una potencia de neutralización más modesta (Brouwer et al., 2020; Chi et al., 2020; Wec et al., 2020; Zost et al., 2020a, 2020b).

Un problema de seguridad para el uso clínico de anticuerpos es la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección. Se ha notificado ADE *in vitro* para la vacunación contra el virus sincitial respiratorio, la vacunación contra el virus del dengue o la infección por el virus del dengue (Arvin et al., 2020). La ADE a menudo está mediada por receptores Fc para inmunoglobulina G (IgG) (FcγRs), receptores del complemento (CRs), o ambos, y se observa con mayor frecuencia en monocitos/macrófagos y células B (Iwasaki y Yang, 2020; Ubol y Halstead, 2010). Los estudios *in vitro* han demostrado que la ADE mediada por FcγR de la infección por SARS-CoV de células ACE2 negativas (Jaume et al., 2011; Kam et al., 2007; Wan et al., 2020; Wang et al., 2014; Yilla et al., 2005; Yip et al., 2014, 2016). Investigaciones adicionales han demostrado que la mejora de la infección independiente de FcγR del SARS-CoV en las células Vero y ha aislado un Ab que puede haber mejorado la carga viral pulmonar y la patología *in vivo*. (Wang et al., 2016). Se desconoce la capacidad del SARS-CoV-2 S Abs para mediar en la mejora de la infección *in vivo*, pero es una preocupación teórica para el desarrollo de vacunas contra la COVID-19 (Arvin et al., 2020; Bourmazos et al., 2020; Haynes et al., 2020; Iwasaki y Yang, 2020).

Aquí, identificamos potentes RBD y NTD Abs neutralizantes *in vitro*, así como RBD y NTD Abs que mejoran la infección de individuos infectados con SARS-CoV o SARS-CoV-2. La microscopía electrónica de tinción negativa (NSEM) y la microscopía crioelectrónica (crio-EM) revelaron patrones de unión distintos y los epítomos precisos de Abs que mejoran y neutralizan la infección. Los estudios *in vitro* demostraron que los abs rbd es seleccionados mediaron por la mejora de la infección dependiente de FcγR, mientras que los abs NTD indujeron una mejora de la infección independiente de FcγR. Sin embargo, utilizando modelos de monos y ratones de infección por SARS-CoV-2, ninguno de los Abs que mejoran la infección *in vitro* mejoró la replicación del virus SARS-CoV-2 o el virus infeccioso en el pulmón *in vivo*. Tres de los 46 monos tenían niveles de patología pulmonar o lavado broncoalveolar (BAL) mayores que los controles. Sin

Comentado [M11]: Auto-anticuerpos encontrados para RBD y NTD, PERO SI BIEN FACILITAN LA INFECCION DEL HUESPED NINGUNO DE LOS ADE, AUMENTA LA VELOCIDAD DE REPLICACIÓN DEL VIRUS.

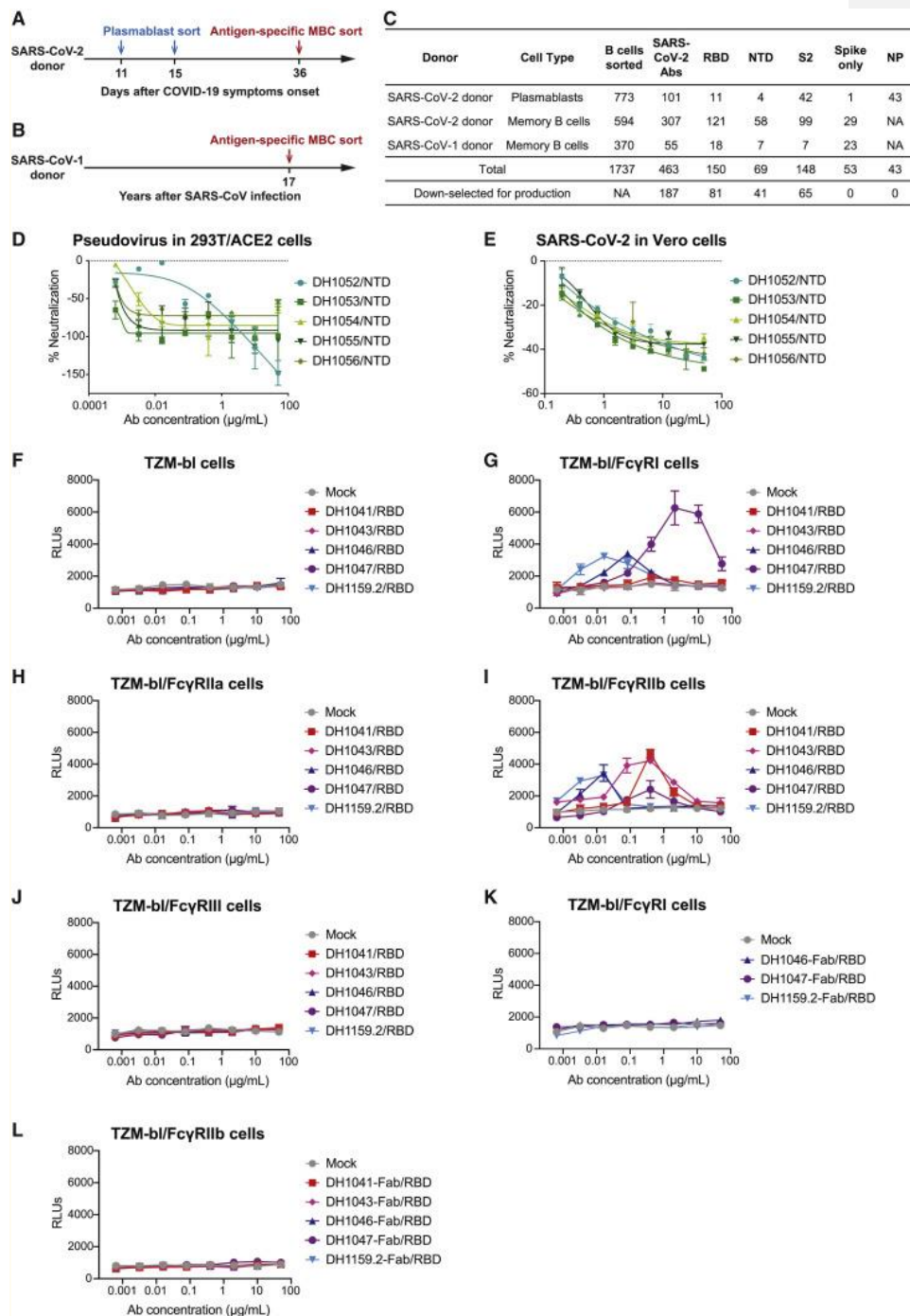
embargo, los estudios repetidos con rangos de dosis de Abs *potenciadores in vitro* no aumentaron la patología pulmonar. Por lo tanto, **el RBD y el NTD Abs que mejoran la infección *in vitro* controlaron el virus *in vivo* y rara vez se asociaron con una patología pulmonar mejorada.**

[Vete a:](#)

Resultados

Aislamiento de los anticuerpos neutralizantes y potenciadores de la infección por SARS-CoV-2

Se aislaron abs monoclonales reactivos al SARS-CoV-2 de plasmablastos o células B de memoria reactivas al SARS-CoV-2 ([Liao et al., 2009, 2013](#)) de un individuo infectado por SARS-CoV-2 11, 15 y 36 días después de la aparición de los síntomas. Para identificar abs neutralizantes contra el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, se aislaron células B S reactivas al SARS-CoV-2 de un individuo infectado con SARS-CoV ~17 años antes de la recolección de muestras ([Figuras 1 A, 1B y yS1A–S1D](#)), [S1A–S1D](#)). De un total de 1.737 células B, se aislaron 463 Abs que se unieron al SARS-CoV-2 S o proteínas nucleocápside en pantallas de unión de alto rendimiento ([Figura 1C](#); [Cuadro S1](#)). Se seleccionaron 187 Abs utilizando alta magnitud de unión, reactividad cruzada con CoV humanos, alta frecuencia de mutación somática y un HCDR3 largo como criterios de selección. Se examinaron los Abs seleccionados para la neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-2 competente para la replicación. Cuarenta y cuatro de los 81 RBD Abs exhibieron neutralización del pseudovirus SARS-CoV-2 o virus competente para la replicación ([Figuras S1 E–S1J](#); [Cuadro S2](#)). Diez de los 41 NTD Abs neutralizaron el SARS-CoV-2 en los ensayos de reducción de placa y pseudovirus 293T/ACE2, en un CI_{50} tan bajo como 39 ng/mL ([Figuras S1K–S1M](#); [Cuadro S2](#)). Además, 5 Abs NTD no neutralizantes mejoraron la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 en 293T/ACE2 y la infección por el virus nano-luciferasa del SARS-CoV-2 competente para la replicación de las células Vero ([Figuras 1D y 1E](#); [Huo et al., 2020](#)). La mejora de la infección por NTD Ab dependo de la expresión de ACE2. Tanto las células 293T que expresan ACE2 utilizadas para ensayos de pseudovirus como las células Vero carecen de expresión de FcγR ([Takada et al., 2007](#)). Por lo tanto, **la mejora de la NTD de la infección por SARS-CoV-2 fue independiente de FcγR.**



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 1

El dominio de unión al receptor SARS-CoV-2 (RBD) y el dominio N-terminal (NTD) Abs median la mejora de la infección (A y B) Cronología de la toma de muestras de sangre, plasmablastos y/o clasificación de células B de memoria específicas de antígenos (MBC) y aislamiento de Ab de donantes convalecientes (A) de SARS-CoV-2 y (B) sars-CoV.

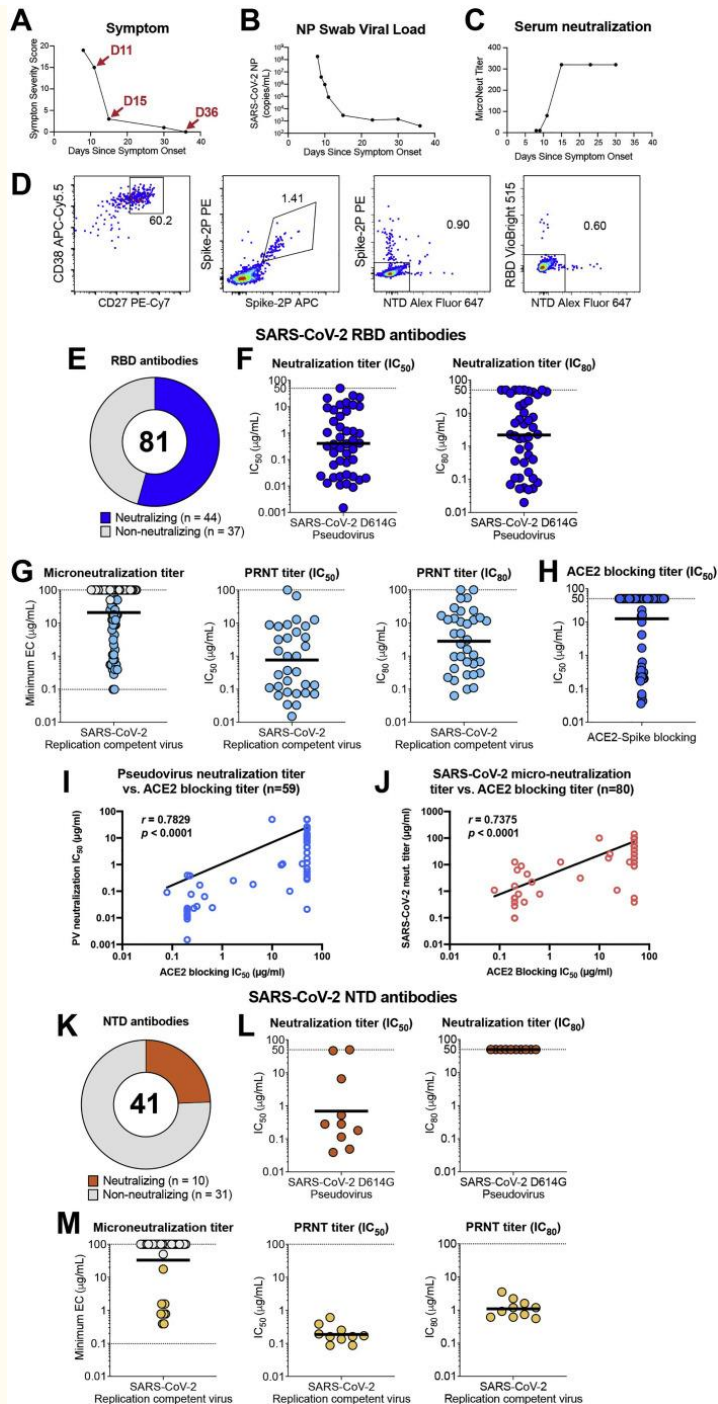
(C) Resumen del número y la especificidad de los abs aislados de cada donante.

(D y E) *Curvas de* neutralización in vitro para Abs que mejoran la infección por NTD contra (D) SARS-CoV-2 D614G pseudotipado en células 293T-hACE2, y (E) nanoluciferasa (nLuc) SARS-CoV-2 competente para replicación en células Vero.

(F–J) Mejora de la infección por SARS-CoV-2 pseudotipada dependiente de FcγR cuando se agregó RBD Abs o control de medio simulado a (F) células TZM-bl parentales y células TZM-bl que expresan de manera estable los receptores FcγR humanos (G) FcγRI, (H) FcγRIIa, (I) FcγRIIb o (J) FcγRIII.

(K y L) El efecto de las regiones de unión al antígeno del fragmento RBD Ab (Fabs) sobre la infección pseudotipada por SARS-CoV-2 D614G se probó en (K) células TZM-bl que expresan FcγRI y (L) células TZM-bl que expresan FcγRIIb. Los datos se representan como media ± SEM. Se realizaron tres o cuatro experimentos independientes y se muestran datos representativos.

Ver también [Figura S1](#).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S1

Aislamiento de Abs reactivos al SARS-CoV-2 de plasmablastos clasificados en células individuales y células B de memoria de donantes convalecientes de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1, relacionados con [Figura 1](#)

(A) Puntuaciones de gravedad de los síntomas del donante convaleciente de COVID-19. El método para determinar la puntuación de gravedad se encuentra en material complementario en línea. Las flechas rojas indican los puntos de tiempo de muestreo de sangre que utilizamos para aislar Abs.

(B) Carga viral de hisopos nasofaríngeos (NP).

(C) Título de micronarización sérica. Los títulos de micronarización se definieron como la dilución sérica más alta que neutraliza todo el virus, o una concentración inhibitoria del 99% (CI₉₉).

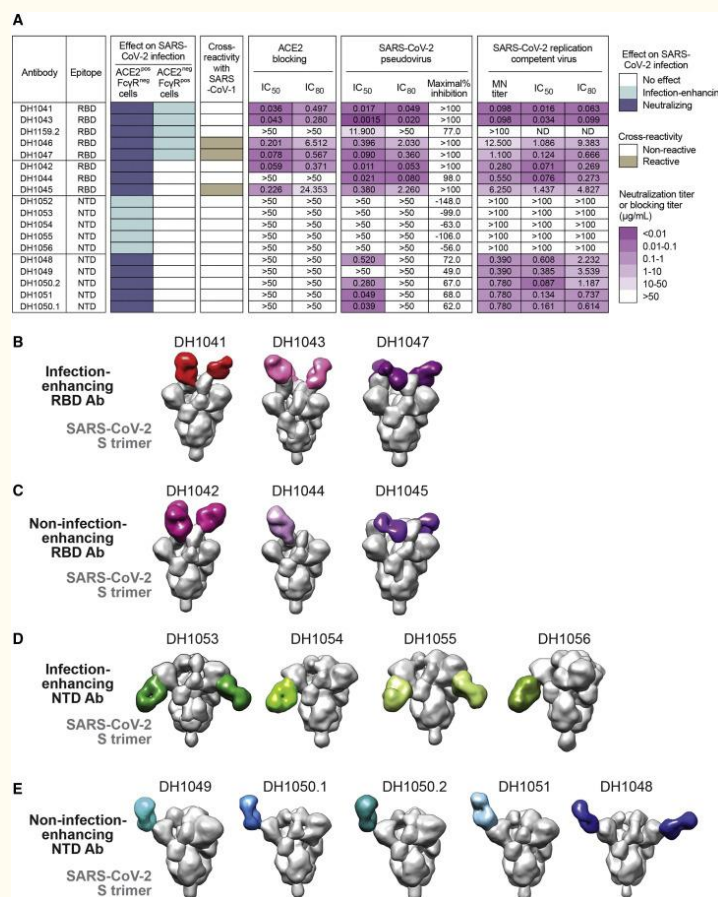
(D) Estrategia de citometría de flujo para la clasificación imparcial de plasmablastos o la clasificación de células B de memoria específica de antígenos. En el día 11 y el día 15 después del inicio del síntoma de COVID-19, plasmablastos (CD14/CD16/CD3/CD235a/CD19/CD20^{-----+bajo}/IgD/CD27^{-alto}/CD38^{alto}) de un donante de SARS-CoV-2. Las células B específicas de antígeno de donantes de SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 se clasificaron con diferentes combinaciones de las sondas SARS-CoV-2 S-2P, RBD, NTD. Se mostraron datos representativos para clasificar Spike doble positivo, Spike o NTD, así como subconjuntos RBD o NTD.^{****}

(E-H) RBD Ab neutralization activity. (E) Proportion of SARS-CoV-2 RBD Abs (n = 81) that exhibited detectable neutralization in the microneutralization assay. (F) Neutralization IC₅₀ and IC₈₀ of RBD neutralizing Abs (NAbs) against pseudotyped SARS-CoV-2. (G) Microneutralization titer, plaque reduction neutralization test (PRNT) IC₅₀ and IC₈₀ de RBD NAbs contra SARS-CoV-2 competente para replicación. El título de microneutralización se definió como la concentración más baja de Ab que neutralizó todo el virus, o la concentración inhibitoria del 99% (CI₉₉). Los abdominales con títulos de microneutralización indetectables se muestran como símbolos grises y los nAbs se representan con símbolos azules. (H) Bloqueo de RBD NAbs de la unión de ACE2 a la proteína SARS-CoV-2 Spike (S). El título de bloqueo se muestra como IC₅₀.

(I-J) Análisis de correlación de RBD Abs entre las actividades de neutralización y bloqueo de ACE2. Se realizó un análisis de correlación de Spearman para (I) IC de bloqueo de ACE2₅₀ frente al CI de neutralización fotovoltáica₅₀, así como (J) para el CI de bloqueo ACE2₅₀ versus títulos de neutralización del SARS-CoV-2 (indicados por la concentración más baja que no muestra CPE). En este análisis se utilizaron ABS RBD purificados en [las Tablas S1 y S2](#) que tienen datos de neutralización de pseudovirus (n = 59) o datos de ensayo de microneutralización del SARS-CoV-2 (n = 80). Los valores de P (p) y los coeficientes de correlación (r) se indican para cada figura.

(K-M) Actividad de neutralización de NTD Abs. (K) Proporción de ABS NTD NTD del SARS-CoV-2 (n = 41) que exhibieron neutralización detectable en el ensayo de microneutralización. (L) IC de neutralización₅₀ y CI₈₀ de Abs neutralizante NTD contra el SARS-CoV-2 pseudotipado. (M) Título de microneutralización, PRNT IC₅₀ y CI₈₀ de Abs neutralizante de NTD contra el SARS-CoV-2 competente para la replicación. Los Abdominales con títulos de microneutralización indetectables se muestran como símbolos grises y los Abs neutralizantes se representan con símbolos naranjas. Las barras horizontales representan los medios geométricos para cada grupo de Abs.

Para evaluar la mejora de la infección dependiente de FcγR, se probaron 100 IgG1 Abs S reactivos por su capacidad para facilitar la infección por SARS-CoV-2 de células TZM-bl que expresan varios FcγR pero carecen de ACE2 y TMPRSS2 (Tabla S2). Tres o cinco Abs permitieron la infección por SARS-CoV-2 de células TZM-bl que expresan FcγRI o FcγRIIb, respectivamente (Figuras 1F–1J). Los fragmentos de unión a antígenos (Fabs) de estos Abs no mediaron la mejora de la infección de las células TZM-bl que expresan FcγRI o FcγRIIb, demostrando dependencia de Fc para la mejora (Figuras 1K y 1L). Por lo tanto, RBD Abs puede ser neutralizante en las células 293T que expresan ACE2, potenciador de la infección en las células TZM-bl que expresan FcγR, o ambos (Figura 2 A). NTD Abs puede ser neutralizante o potenciador de la infección en las células ACE2 293T o veroE6 (Figura 2A).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 2

Caracterización estructural y fenotípica de RBD y NTD Abs que mejoran la infección y no mejoran la infección.

Comentado [M12]: Proteína Spike(S)

Su estructura contiene las subunidades funcionales S1 y S2, ubicadas en su ectodominio⁵¹.

La subunidad S1 presenta un dominio N-terminal, un dominio C-terminal⁵¹ y un dominio de unión al receptor conservado (RBD) que contiene un núcleo y un motivo de unión al receptor (RBM)⁵¹. Esta subunidad media la unión al receptor ECA 2, donde los residuos de aminoácidos como Lys317 y Phe486 del dominio RBD podrían ser claves para esta interacción^{51,52}. Por otro lado, la subunidad S2 posee en su estructura un dominio péptido de fusión (FP), dominios de repetición heptad-1 y -2 (HR1, HR2) y un dominio transmembrana (TM), que le permiten la fusión de las membranas viral y celular^{51,52}.

La proteína S requiere un clivaje por proteasa para la activación de su potencial de fusión. Se han propuesto dos pasos secuenciales para el modelo de clivaje; un clivaje inicial entre S1 y S2, y la posterior activación de clivaje en el sitio S2'⁵³.

Además, presenta una gran superficie mutada, con cuatro insertos nuevos en la proteína; de los cuales, tres se ubican en el primer dominio NTD, mientras que el cuarto se ubica inmediatamente antes del sitio de escisión S2 y dentro de la interfaz de interacción de homo-trimerización¹⁶. Asimismo, el dominio RBD no está afectado por estos insertos, pero es la región más mutada con potenciales alteraciones en su función de unión a ECA2¹⁶.

<http://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v2i1i1.3327>

Comentado [M13]: EN B, C, LA CONFORMACIÓN ESPACIAL DE LOS AUTOANTICUERPOS PARA EL DOMINIO DE UNIÓN DEL RBD; PARA FACILITAR LA INFECCIÓN (TRES ESTRUCTURAS) Y OTRAS TRES ESTRUCTURAS QUE NO FACILITAN LA INFECCIÓN. SE ENTIENDE QUE HAYA DOS LLAVES PARA ENCENDER O APAGAR EL PROCESO DE INFECCIÓN, AQUÍ SE MUESTRAN OTRAS 2 PARA ENCENDER Y OTRAS 2 PARA APAGAR, ESTO PUEDE SER EXPLICADO POR UN TRABAJO SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS GLICANOS COMO PUERTA DE ENTRADA PARA EL VIRUS, AL TENER CADA POSICIÓN UN LUGAR DE ACOPLE SUPERIOR E INFERIOR. EXPLICARÍA LAS TRES CONFORMACIONES ESPACIAL PARA FACILITAR Y LA OTRAS TRES QUE NO FACILITAN LA INFECCIÓN. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00758-3>

PARA EL DOMINIO TERMINAL NTD EL MODELO DE GLICANOS NO BASTA PARA EXPLICAR EL MAYOR NUMERO (MAS DE 6)

Para el dominio de NTD (C,D), otra interferencia mas está actuando, aparte de los glicanos.. Pudiendo ser un autoanticuerpo mediado por la presencia pasada de otro coronavirus. Que se une en forma débil con el ntd terminal.

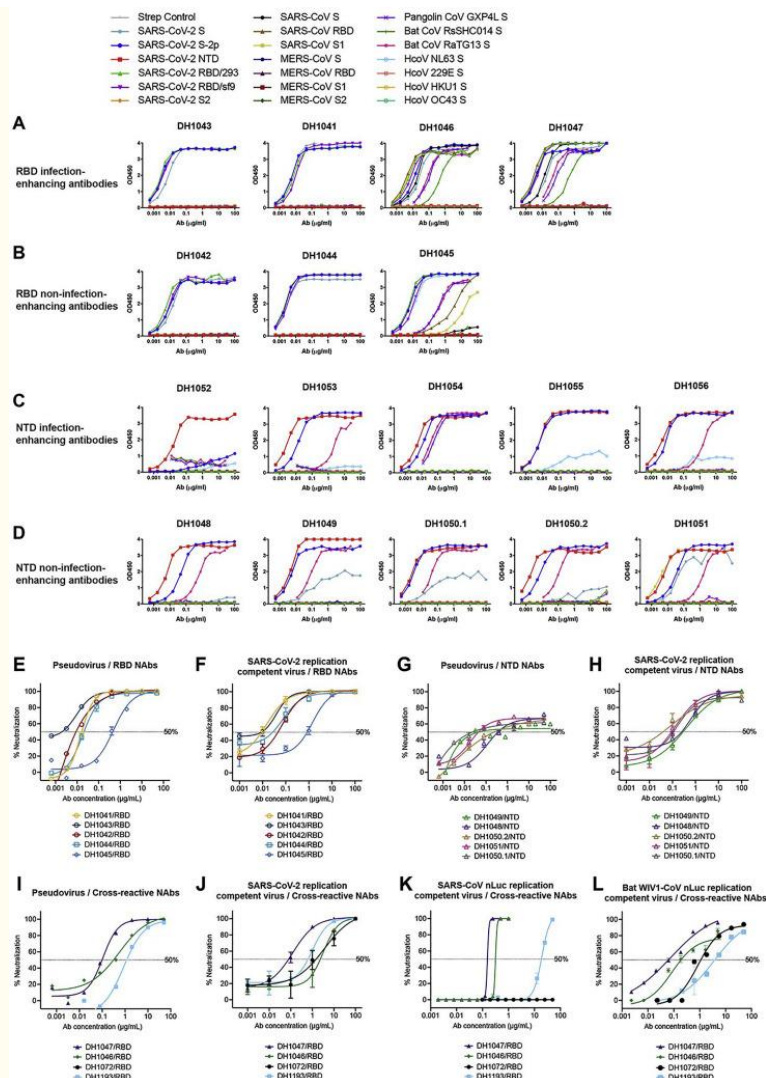
(A) Resumen del epítipo Ab, la unión y la actividad neutralizante o potenciadora de la infección en células ACE2 positivas/FcγR-negativas o células ACE2-negativas/FcγR-positivas. Las funciones Ab están codificadas por colores en función de la tecla que se muestra a la derecha. Título de MN, título de micronarnización; ND, no determinado.

(B–E) Reconstrucción 3D de imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa de trómeros de ectodominio estabilizados del SARS-CoV-2 S (S-2P; gris) unidos a los Fabs (varios colores) de (B y D) anticuerpos RBD o NTD que mejoran la infección o (C y E) que no mejoran la infección.

Ver también [Figura S2](#) y [S3S3](#).

Caracterización de Spike Abs potenciador de infecciones

Se compararon los fenotipos y los modos de unión de RBD Abs que mejoraron o no la infección para dilucidar las diferencias entre ellos. El RBD Abs seleccionado neutralizó el pseudovirus del SARS-CoV-2 y/o el virus competente para la replicación en células que expresan ACE2 ([Figuras 2A y yS2](#)), a pesar de que cinco de estos Abs median la mejora de la infección en células TZM-bl ACE2 negativas, FcγR-positivas ([Figuras 1F–1L, 2A, y yS2](#)). Ambos tipos de RBD Abs seleccionados bloquearon la unión de ACE2 a la proteína S y ambos tipos de RBD Abs unidos a S con altas afinidades (rango = 0.1 a 9 nM) ([Tabla S3; Figura 2A](#)). Por lo tanto, los Abs RBD que mejoran o no mejoran la infección mostraron similitudes en el bloqueo de ACE2, la afinidad y la neutralización de la infección por SARS-CoV-2 dependiente de ACE2 ([Figura 2A](#)).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S2

Actividades de enlace y neutralización de los abs del SARS-CoV-2 seleccionados, relacionadas con [Figura 2](#)

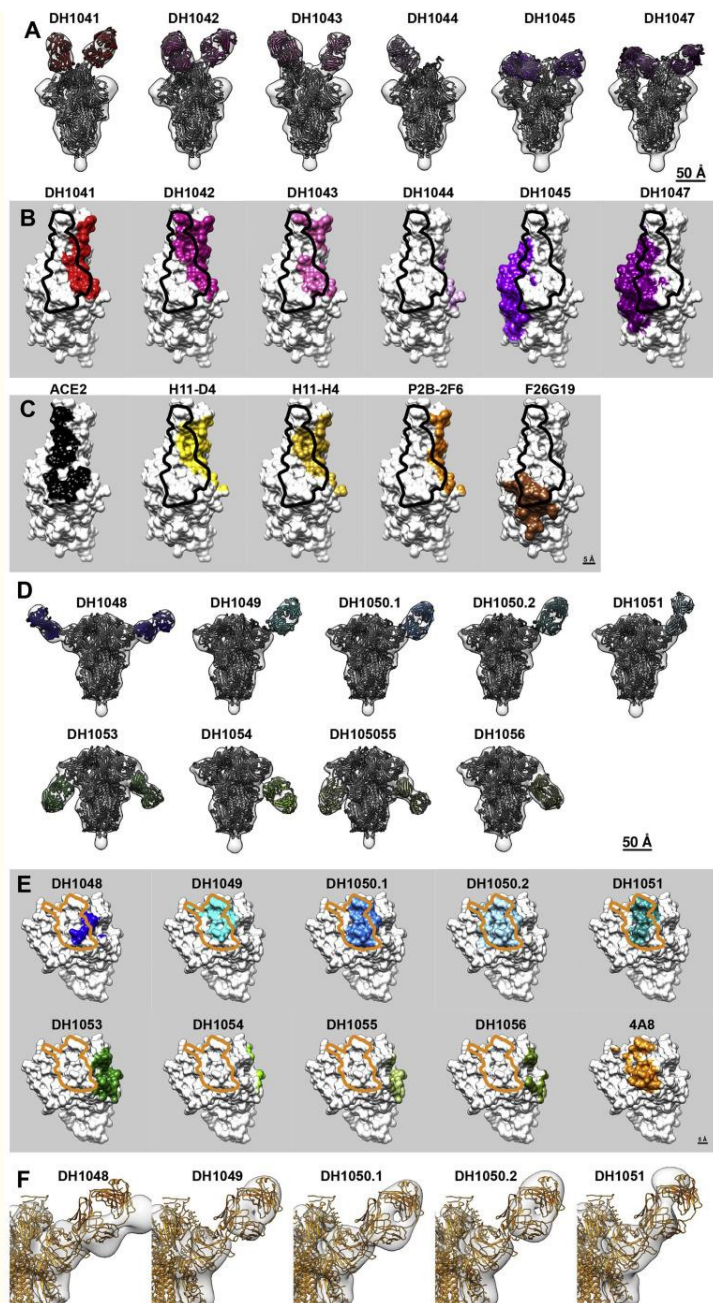
(A-D) Diferentes antígenos virales de SARS-CoV-2 u otros antígenos virales de CoV se recubrieron en placas y se detectaron con Abs diluidos en serie (A) que mejoran la infección por RBD, (B) Abs que no mejoran la infección de RBD, (C) Abs que mejoran la infección de NTD y (D) Abs que no mejoran la infección de NTD.

(E-F) Curvas de neutralización para RBD Abs contra SARS-CoV-2 pseudotipado (E) y competente para replicación (F).

(G-H) Curvas de neutralización para NTD Abs frente al SARS-CoV-2 pseudotipado (G) y competente para replicación (H).

(I-L) Curvas de neutralización para la neutralización cruzada de Abs contra el virus (L) pseudotipado (I) y competente para replicación (J), la nanolufersa (L) del SARS-CoV-1 y el virus BAT WIV1-CoV nLuc (L).

Para seis RBD Abs representativos, obtuvimos reconstrucciones NSEM de Fabs en complejo con trímero de ectodominio S estabilizado. RBD ABS DH1041 y DH1043 que mejoran la infección unidos con un enfoque vertical ([Figura 2B](#)), paralelo al eje central del trímero S, similar a los Abs DH1042 y DH1044 que no mejoran la infección ([Figura 2C](#)). Los epítomos de Abs DH1041, DH1042 y DH1043 se superpusieron con los del receptor ACE-2 ([Wec et al., 2020](#)), consistente con su capacidad para bloquear la unión de ACE-2 a la proteína S ([Figuras 2UN A, S3 A, S3 A y S3B](#)). Sus epítomos fueron similares a los de tres Abs descritos anteriormente, P2B-2F6 ([Ju et al., 2020](#)), H11-H4 y H11-D4 ([Figura S3C](#); [Huo et al., 2020](#); [Zhou et al., 2020a](#)). El epítomo de otro RBD Ab DH1044 que no mejora la infección se desplazó solo ligeramente en relación con DH1041, DH1042 y DH1043 ([Figura 2C](#)), pero dio lugar a que DH1044 no bloqueara la unión a ACE2 ([Figuras 2UN A, S3A, S3A y S3B](#)). Los dos RBD Abs restantes, DH1045 y DH1047, reaccionaron de forma cruzada con SARS-CoV y SARS-CoV-2 S ([Figuras 2UN A, S2A, S2A y S2B](#)). DH1047 también reaccionó con las proteínas de espiga coV de murciélago y pangolín ([Figuras 2A y yS2A, S2A](#)). Aunque DH1047 medió la infección dependiente de FcγR de células TZM-bl y DH1045 no, ambos Abs se unieron a conformaciones S de RBD-up con un ángulo de aproximación más horizontal ([Figuras 2B, 2C y yS3A, S3A](#); [Pak et al., 2009](#)). Por lo tanto, los epítomos y los ángulos de unión de RBD Abs determinados por NSEM no discriminaron entre los Abs que mediaron la mejora de la infección dependiente de FcγR y los que no lo hicieron.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S3

Comparación de los epítomos RBD y NTD de NSEM, relacionados con [Figura 2](#)

(A) Un modelo de espiga (PDB: [6ZGE](#)) y los correspondientes modelos de homología Fab se acoplaron manualmente y se ajustaron rígidamente en cada mapa de densidad de tinción negativa.

(B) El RBD de cada modelo se agranda y se muestra como una superficie blanca, con el epítipo putativo de cada Ab coloreado. El contorno negro indica la huella de enlace ACE2.

(C) Comparación con la huella ace2 y los epítipos de tres Abs publicados con epítipos similares. Consulte el texto principal para obtener referencias.

(D) Un modelo de espiga (PDB: [6ZGE](#)) y los correspondientes modelos de homología Fab se acoplaron manualmente y se ajustaron rígidamente en cada mapa de densidad de tinción negativa.

(E) El NTD de cada modelo se amplía y se muestra como una superficie blanca, con el epítipo de cada Ab coloreado. El contorno naranja indica el epítipo de Ab 4A8, que se muestra en la parte inferior derecha. Los esquemas ilustran que los Abs DH1048-51 neutralizantes comparten el mismo epítipo, mientras que los Abs DH1053-56 que mejoran la infección se unen a un epítipo distinto.

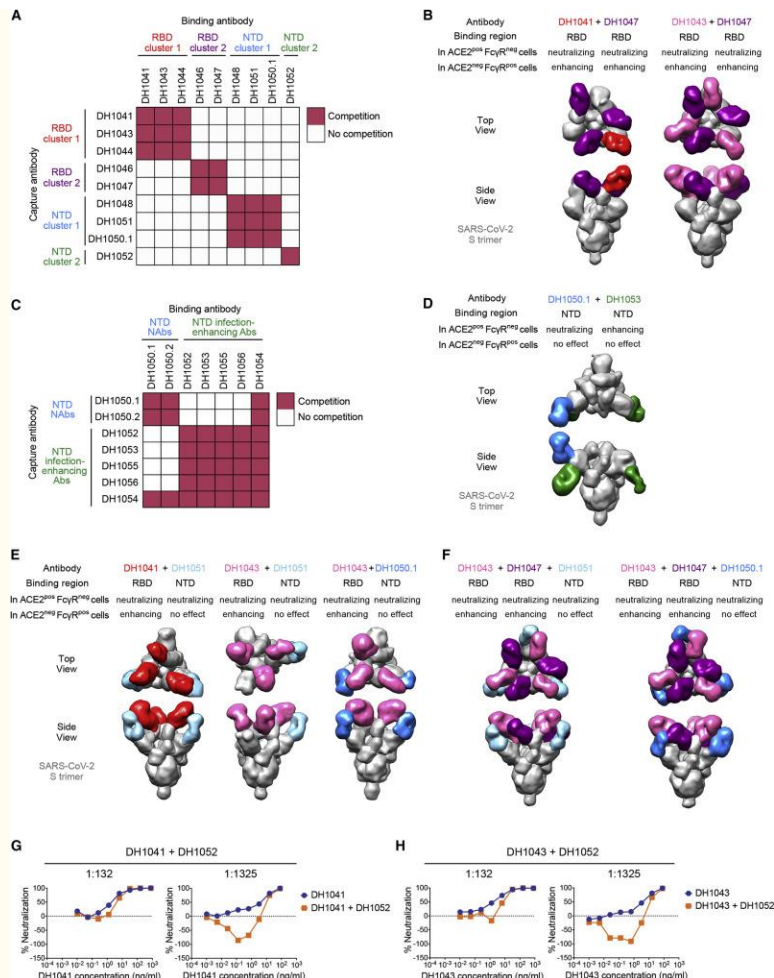
(F) El modelo de complejo de púas con Fab 4A8 (cintas naranjas, PDB: [7C2L](#)) se ajusta rígidamente a cada uno de los mapas NSEM (superficies transparentes). El ajuste cercano de 4A8 en DH1049, DH1050.1 y DH1050.2 indica que las tesis tienen el mismo ángulo de aproximación que 4A8, mientras que DH1048 y DH1051 tienen enfoques ligeramente diferentes.

A continuación, caracterizamos NTD Abs. Los Fabs de neutralización de NTD Abs DH1050.1 y DH1051 se unen a un ectodominio S estabilizado con afinidades de 16 y 19 nM respectivamente, mientras que el Ab DH1052 potenciador de la infección se une a 294 nM de afinidad ([Tabla S3](#)). Las reconstrucciones NSEM obtenidas para nueve Abs NTD mostraron que los Abs NTD independientes de FcγR, que mejoran la infección (DH1053-DH1056) se unieron a S con sus dominios constantes Fab dirigidos hacia abajo hacia la membrana del virus ([Figura 2D](#)), mientras que los cinco Abs neutralizantes dirigidos por NTD (DH1048-DH1051) unidos a S con el dominio constante del Fab dirigido hacia arriba lejos de la membrana del virus ([Figura 2E](#)). Los cinco Abs neutralizantes unen el mismo epítipo que Ab 4A8 ([Chi et al., 2020](#)), con tres de los cinco que tienen el mismo ángulo de aproximación y segmento de genes de cadena pesada (V_H1-24) como 4A8 ([Figuras S3D–S3F](#); [Cuadro S2](#); [Chi et al., 2020](#)). Estos Abdominales NTD pueden constituir una clase Ab neutralizante que puede ser provocada en múltiples individuos. Por lo tanto, los epítipos de la proteína S Ab y los modos de unión se asociaron con la actividad de mejora de la infección de NTD Abs.

Competencia entre los anticuerpos que mejoran la infección y los que no mejoran la infección

Para determinar si los Abs que mejoran la infección podrían competir con los Abs que no mejoran la infección para unirse al ectodominio S, se realizaron ensayos de unión competitiva de resonancia de plasmón de superficie (SPR). RBD Abs segregados en dos grupos, donde Abs dentro de un clúster se bloqueaban entre sí y Abs en diferentes grupos no se bloqueaban entre sí ([Figura 3 A](#)). Un grupo incluía Abs DH1041, DH1043 y DH1044, y el otro grupo incluía Abs DH1046 y DH1047. Las reconstrucciones NSEM mostraron combinaciones de DH1041 y DH1047 Fabs

o DH1043 y DH1047 Fabs unidas simultáneamente a diferentes epítomos del trímero S estabilizado (Figura 3B).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 3

Unión simultánea de abs que mejoran la infección y no mejoran la infección a los trímeros S individuales

(A) Actividad de bloqueo cruzado de RBD y Abs neutralizante de NTD probados por resonancia de plasmón de superficie (SPR). S-2P fue capturado por un Ab (eje y) seguido de la unión por el segundo Ab (eje x).

(B) Reconstrucción 3D del reconocimiento simultáneo del SARS-CoV-2 S-2P por dos RBD Abs DH1041+DH1047 o DH1043+DH1047.

(C) Actividad de bloqueo cruzado de los abs NTD neutralizantes o que mejoran la infección probados por SPR y mostrados como en (A).

(D-F) Reconstrucción 3D de SARS-CoV-2 S-2P unido simultáneamente (D) NTD Abs DH1053 y DH1050.1, (E) AB que mejora la infección por RBD y un Ab que no mejora la infección por NTD, o (F) combinaciones triple-Ab de RBD Ab DH1043, RBD Ab DH1047 y NTD Ab DH1051 (izquierda) o DH1050.1 (derecha).

(G y H) Neutralización rbd Ab de la infección por pseudovirus SARS-CoV-2 D614G de células 293T/ACE2 en presencia de 132 o 1.325 veces más de NTD Ab DH1052 que mejora la infección.

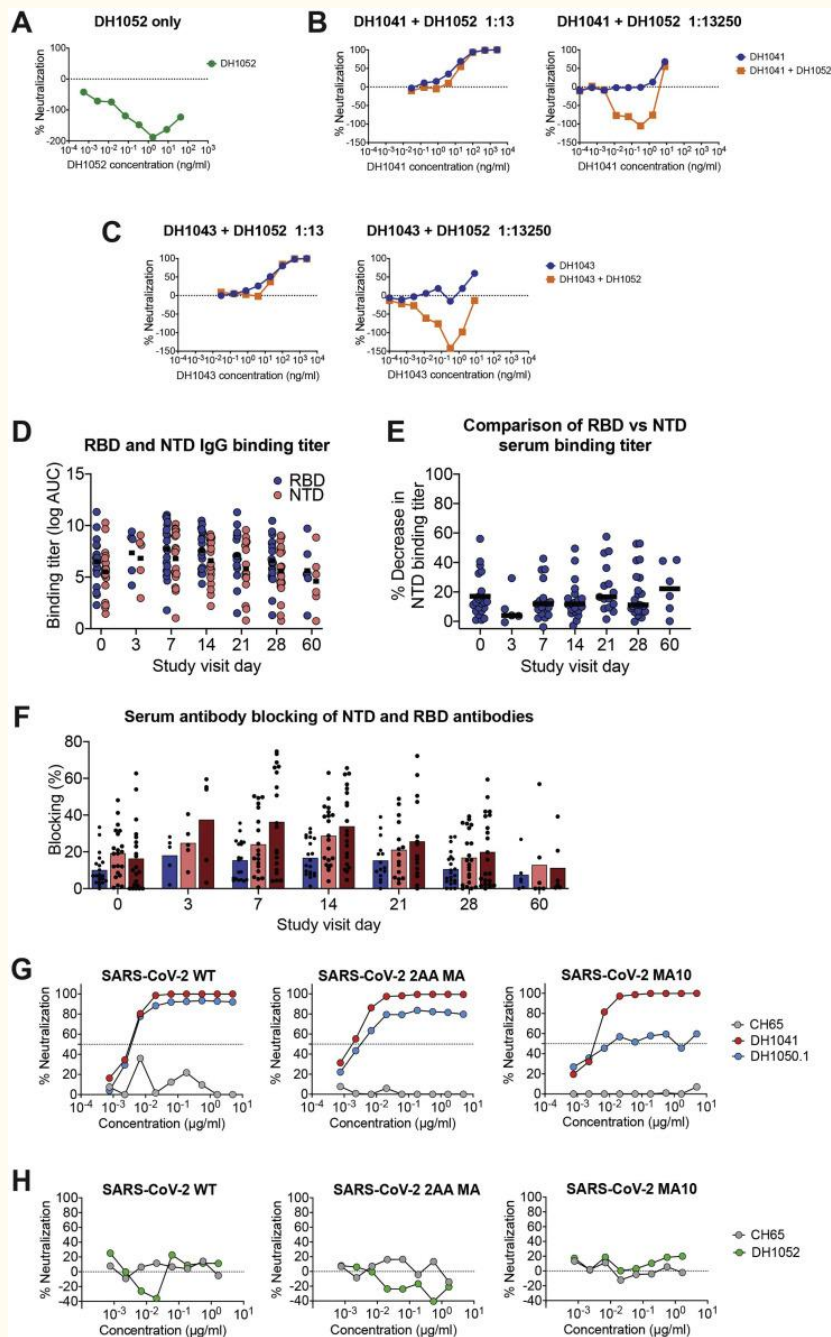
Ver también [Figura S4](#).

NTD Abs también se segregó en dos grupos donde un grupo incluyó abs NTD neutralizante y un segundo grupo incluyó Abs NTD no neutralizantes ([Figuras 3A y 3C](#)). Las reconstrucciones de NSEM confirmaron que los Fabs de neutralizar NTD Ab DH1050.1 y NTD Ab DH1052 que mejoran la infección podrían unirse simultáneamente a epítomos distintos en un solo trímero SARS-CoV-2 S ([Figura 3D](#)). DH1054 fue único, ya que fue capaz de bloquear tanto la mejora de la infección como la neutralización de los anticuerpos NTD ([Figura 3C](#)).

NTD Abs no compitió con RBD Abs para unirse al trímero S ([Figura 3A](#)), sugiriendo que en una mezcla policlonal de Abs, el trímero SARS-CoV-2 S podría unirse tanto a RBD como a NTD Abs. NSEM mostró que 1 o 2 ABS RBD neutralizantes diferentes (DH1043 y DH1047) podrían unirse al mismo protómero S que neutralizando NTD Abs DH1050.1 o DH1051 ([Figuras 3E y 3F](#)). Por lo tanto, en presencia de una respuesta Ab policlonal, el trímero S podría estar unido por múltiples Fabs de RBD y NTD Abs.

Mejora de la infección independiente de FcγR en presencia de abs neutralizante

La determinación estructural de los modos de unión a Ab demostró que ciertos Abs potenciador de la infección y Abs no potenciador de la infección unidos a epítomos distintos en el mismo protómero S ([Figuras 3A–3F](#)). Ab DH1052 que mejora la infección y neutraliza RBD Ab DH1041 se aislaron del mismo individuo. Planteamos la hipótesis de que el resultado de la infección dependería de qué Ab estuviera presente en la concentración más alta. Cuando se evaluó la neutralización de DH1041 en presencia de un exceso de 1.325 veces de Ab DH1052, se observó una mejora de la infección cuando la concentración de DH1041 estaba por debajo de 10 ng/mL ([Figuras 3G y yS4 A–S4C](#)). Se obtuvo un resultado casi idéntico cuando se examinó la neutralización por DH1043 ([Figuras 3H y yS4A–S4C](#)). En 21 seres humanos infectados por SARS-CoV-2, los títulos séricos de IgG de RBD y NTD fueron comparables ([Figuras S4D y S4E](#)). Además, la prevalencia de DH1052 versus DH1041 Abs se evaluó mediante ensayos de bloqueo y se encontró que era solo modestamente mayor para DH1052 ([Figura S4F](#)). Por lo tanto, se requirió un exceso de ~1,000 veces de Ab NTD que mejora la infección para superar el efecto de un potente Ab neutralizante de RBD *in vitro*, pero tales cantidades excesivas de DH1052 no se observaron durante la infección natural ([Figuras 3G, 3H, y yS4S4D–S4F](#)).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S4

Análisis in vitro de muestras de suero humanas infectadas con Abs y SARS-CoV-2, relacionadas con [Figuras 3, 55 y 77](#)

(A-C) Efecto de la combinación de RBD y NTD Abs que mejoran la infección por SARS-CoV-2 en células que expresan ACE2. El NTD Ab DH1052 que mejora la infección se probó solo (A) o mezclado con RBD Abs DH1041 (B) o DH1043 (C) que mejoran la infección en una proporción de 1:13 o una proporción de 1:13250, respectivamente. Las mezclas NTD:RBD Ab (naranja), así como RBD Ab solo (azul), se diluyeron en serie cinco veces y se probaron para su neutralización contra el pseudovirus SARS-CoV-2 D614G en células 293T/ACE2.

(D-F) Comparación de las respuestas de Ab séricas dirigidas por RBD y NTD en humanos infectados por SARS-CoV-2.

(D) Títulos de unión de IgG sérica a RBD (azul) y NTD (salmón) medidos por ELISA como área logarítmica bajo curva (AUC). Cada símbolo representa a un participante individual del estudio, con el título de unión medio para el día de la visita que se muestra como una barra horizontal negra.

(E) Disminución porcentual en la unión a NTD en relación con el título de unión a RBD. Cada símbolo representa el cambio en el título vinculante para un sujeto de estudio individual. La disminución media se muestra como una barra horizontal negra.

(F) Bloqueo sérico de RBD neutralizante Ab DH1041 (azul) o NTD neutralizante Ab DH1050.1 (salmón), o Ab DH1052 no neutralizante (burdeos) unido al pico de SARS-CoV-2. Los símbolos negros muestran a los participantes individuales del estudio. El porcentaje de bloqueo medio para el día de la visita se muestra como una barra llena.

(G-H) Actividades de neutralización de neutralización y mejora del Abs contra el SARS-CoV-2 de tipo salvaje (WT) y adaptado al ratón.

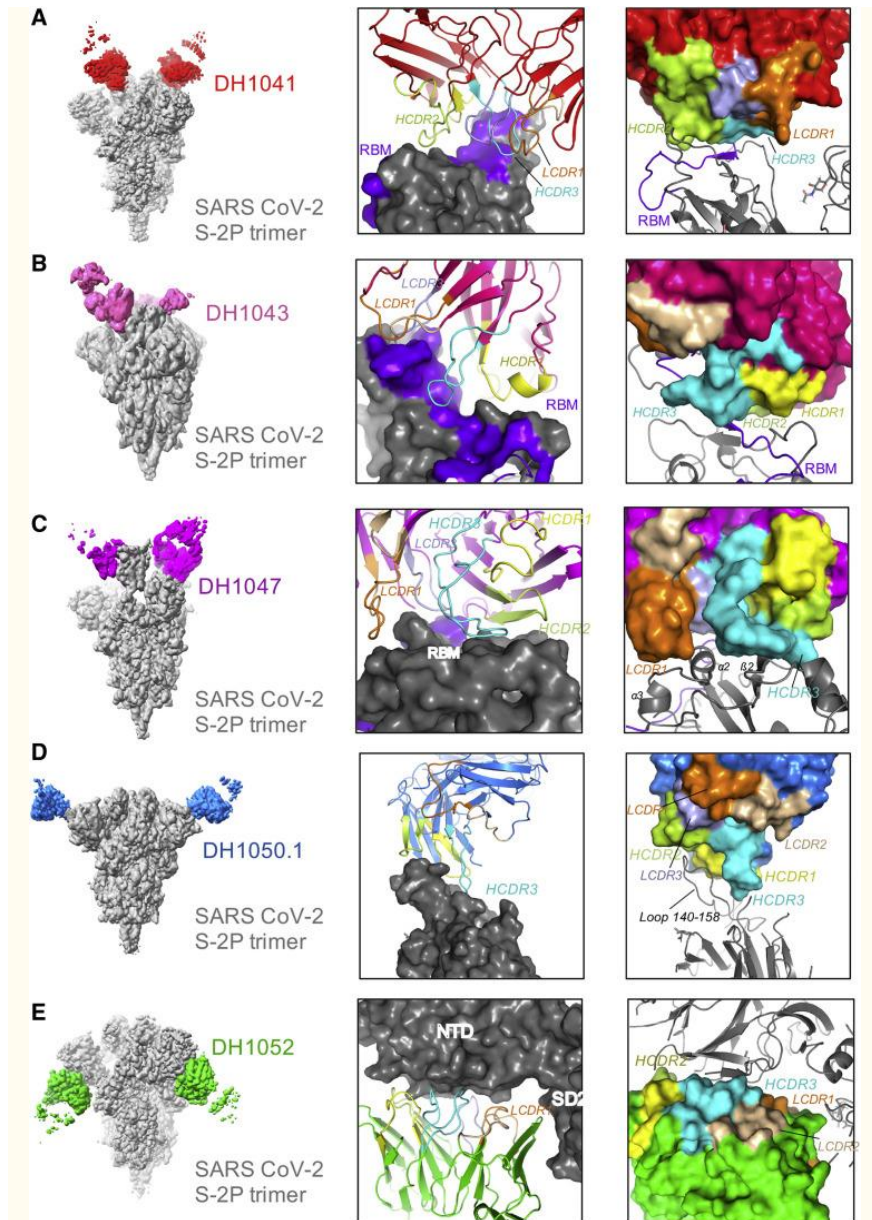
(G) Se probaron las actividades de neutralización de NTD Abs DH1050.1, RBD neutralizando y mejorando Abs DH1041 para detectar actividades de neutralización contra el virus WT, el virus 2AA MA adaptado al ratón y el virus MA10 adaptado al ratón en el ensayo de neutralización de virus vivos. Se utilizó CH65 Ab como control. Se mostró el valor medio de neutralización (%) de los pozos duplicados.

(H) Se probaron actividades de neutralización de Ab DH1052 que mejoran las NTD ab DH1052 y control de Ab CH65 en el ensayo de neutralización contra WTvirus, 2AA MA adaptado por ratón y MA10 adaptado por ratón en el ensayo de neutralización de virus vivos. Se mostraron valores medios de neutralización (%) de pozos duplicados.

Determinación estructural crio-EM de epítopos AB dirigidos por RBD y NTD

Para visualizar los detalles a nivel atómico de sus interacciones con la proteína S, se utilizó crio-EM para la determinación estructural de Abs representativos seleccionados de los paneles de RBD y Abs dirigidos por NTD. Para los tres Abs dirigidos por RBD, los conjuntos de datos crio-EM revelaron poblaciones heterogéneas de S ectodominio "2P" (S-2P) ([Wrapp et al., 2020b](#)) con al menos un RBD en la posición "arriba" ([Figura 4](#) ; [Datos S1](#)). No se encontró ninguna población S nologanded ni ninguna población S 3-RBD-down, aunque S-2P nologanded muestra consistentemente una relación 1:1 de las poblaciones 1-RBD-up y 3-RBD-down

(Henderson et al., 2020; Muros et al., 2020). Todos los trímeros S-2P estaban unidos estequiométricamente a tres Fabs, con Abs unido a RBD hacia arriba y hacia abajo en un trímero S-2P.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 4

Microscopía crio-electrónica de Abs neutralizante y no neutralizante en complejo con ectodominio de pico SARS-CoV-2

Estructuras de la proteína SARS-CoV-2 S en complejo con RBD Abs (A) DH1041 (rojo), (B) DH1043 (rosa), (C) DH1047 (magenta), (D) neutralizante NTD Ab DH1050.1 (azul) y (E) NTD Ab DH1052 (verde). Cada Ab está unido a S-2P que se muestra en gris con su RBM de color azul púrpura. (Derecha) Vistas ampliadas de las interacciones Ab con los trímeros S-2P. Los bucles de determinación de complementariedad Ab (CDR) son de color: HCDR1 amarillo, HCDR2 limón, HCDR3 cian, LCDR1 naranja, LCDR2 trigo y LCDR3 azul claro. Consulte también [Datos S1](#).

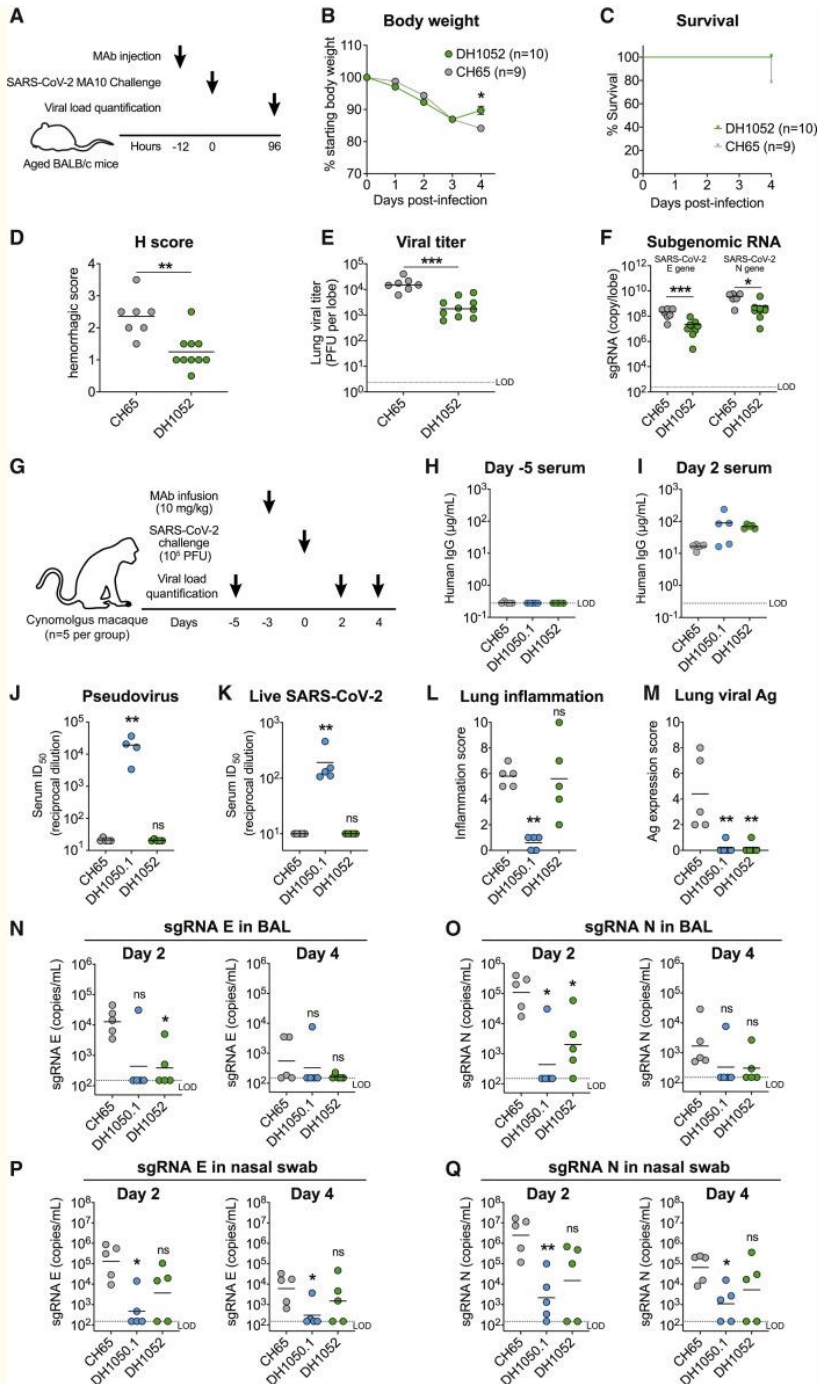
Observamos que los epítomos primarios de DH1041 y DH1043 se centraron en el motivo de unión al receptor (RBM; residuos 483–506) de la RBD ([Figuras 4A y 4B](#); [Datos S1](#)), proporcionando una base estructural para el fenotipo de bloqueo ACE-2 de estos Abs. Mientras que DH1041 utilizó sus regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) para contactar con el RBM, el paratopo DH1043 incluía sus cadenas pesadas y ligeras. Por el contrario, el epítopo de Ab DH1047 se centró alrededor de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y la hebra $\beta 2$ que se encuentran fuera del extremo N del RBM ([Figura 4C](#); [Datos S1](#)). DH1047 también entró en contacto con los residuos de RBD 500–506 fuera del RBM y se apiló contra el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 3$. El paratopo DH1047 incluía HCDR2, HCDR3 de cadena pesada y LCDR1 y LCDR3 de cadena ligera. El HCDR3 se apila e interactúa con los residuos de la hebra $\beta 2$. Las interacciones con la hebra $\beta 2$ también están mediadas por HCDR2. Similar a DH1041 y DH1043, el DH1047 interactuó con una conformación RBD "hacia arriba" a partir de un protómero adyacente, aunque estas interacciones no se caracterizaron bien debido al desorden en esa región.

A continuación, determinamos las estructuras crio-EM de la neutralización dirigida por NTD Abs DH1050.1 ([Figura 4D](#)) y Ab DH1052 que mejora la infección dirigida por NTD ([Figura 4E](#)), a resoluciones 3.4 y 3.0 Å, respectivamente. Los conjuntos de datos crio-EM de los complejos dh1050.1- y DH1052-bound mostraron Fab unido a picos S-2P 3-RBD-down y 1-RBD-up ([Data S1](#)). De acuerdo con las reconstrucciones de NSEM, el Ab DH1050.1 neutralizante y el Ab DH1052 no neutralizante y potenciador de la infección se unen a las caras opuestas del NTD, con el epítopo para el Ab DH1050.1 neutralizante frente a la membrana de la célula huésped y el epítopo para el Ab DH1052 no neutralizante y que mejora la infección frente a la membrana viral. La contribución dominante al epítopo DH1050.1 provino de la región de bucle NTD 140–158 que se apila contra el Ab HCDR3 y se extiende más lejos en una hendidura formada en la interfaz de los bucles DH1050.1 HCDR1, HCDR2 y HCDR3. El NTD Ab 4A8 descrito anteriormente interactúa con el mismo epítopo de manera similar a DH1050.1, con sus interacciones alargadas que dominan HCDR3. Aunque, DH1050.1 y 4A8 ([Chi et al., 2020](#)) muestran una rotación relativa entre sí sobre los bucles apilados HCDR3 y NTD 140–158. Las cadenas ligeras de DH1050.1 y 4A8 no entran en contacto con la proteína S, lo que es consistente con sus diversos orígenes genéticos de cadena ligera ([Figura 4E](#); [Datos S1](#)). El Ab DH1052 dirigido por NTD que mejora la infección se unía a la NTD en un epítopo frente a la membrana viral y compuesto de residuos que abarcan 27–32, 59–62 y 211–218, con todos los bucles CDR de cadenas pesadas y ligeras involucradas en contactos con la NTD. También observamos contacto

del Ab con el glicano en la posición 603, así como la región SD2 invariante conformacionalmente. Por lo tanto, encontramos que los anticuerpos dirigidos por RBD aislados en este estudio influyeron en la dinámica de RBD y se unieron solo a un pico con al menos un RBD en las conformaciones hacia arriba, y en algunos casos, también indujeron las conformaciones de pico 2-RBD-up y 3-RBD-up. En contraste, los anticuerpos dirigidos por NTD se unieron a los picos 3-RBD-down y 1-RBD-up que están presentes en el S-2P no ligado.

Efecto de los abs NTD potenciadores y neutralizantes in vitro de la infección en modelos de ratón y macaco

A continuación, evaluamos el efecto de Ab DH1052 que mejora la infección por NTD en un modelo de ratón con enfermedad COVID-19 en el que ratones BALB/c envejecidos fueron desafiados con la cepa SARS-CoV-2 MA10 adaptada al ratón ([Leist et al., 2020a](#)). DH1052 carecía de neutralización del SARS-CoV-2 MA10 ([Figuras S4G y S4H](#)). DH1052 o un control de la influenza Ab CH65 se administró 12 h antes de la infección por SARS-CoV-2 MA10 ([Figura 5A](#)). A lo largo de los 4 días de infección, los ratones con infusión de DH1052 exhibieron niveles similares de pérdida de peso corporal y mayor supervivencia que los ratones que recibieron CH65 ([Figuras 5B y 5C](#)). Además, los ratones tratados con DH1052 exhibieron puntuaciones hemorrágicas pulmonares más bajas, títulos más bajos de la unidad de formación de placa viral pulmonar (PFU) y niveles más bajos de ARN subgenómico del tejido pulmonar (sgRNA) en comparación con los ratones de control ([Figuras 5D-5F](#)). Por lo tanto, el tratamiento con DH1052 resultó en una enfermedad menos grave y una replicación viral reducida. Las funciones efectoras mediadas por FcR pueden haber sido el mecanismo de supresión desde DH1052 unido a FcγRI y FcγRIV del ratón ([Tabla S4](#)).



[Open in a separate window](#)

Figure 5

NTD Ab DH1052 does not always enhance SARS-CoV-2 replication or disease *in vivo*

(A–F) DH1052 passive immunization and murine SARS-CoV-2 challenge (A) study design, (B) body weight, (C) survival, (D) hemorrhagic scores, (E) lung viral titers, and (F) SARS-CoV-2 envelope (E) and nucleocapsid (N) gene subgenomic RNA (sgRNA).

(G–Q) Reduction of SARS-CoV-2 replication and disease in cynomolgus macaques by prophylactic administration of an NTD-neutralizing Ab DH1050.1 or an NTD *in vitro* infection-enhancing Ab DH1052.

(G) DH1050.1 and DH1052 prophylaxis cynomolgus macaque (n = 5 per group) study design. CH65 was used as a negative control Ab.

(H and I) Serum human IgG concentrations at (H) day –5 and (I) day 2.

(J and K) Day 2 serum neutralization titers shown as the reciprocal serum dilution that inhibits 50% (ID₅₀) of (J) pseudotyped SARS-CoV-2 replication in 293T/ACE2 cells or (K) SARS-CoV-2 replication in Vero cells.

(L and M) Lung histopathology 4 days post-infection. Lung sections were scored for (L) inflammation by hematoxylin and eosin (H&E) staining, and for (M) the presence of SARS-CoV-2 nucleocapsid by immunohistochemistry (IHC) staining.

(N–Q) Viral load quantified as SARS-CoV-2 E gene sgRNA and N gene sgRNA in (N and O) bronchoalveolar lavage (BAL) or (P and Q) nasal swab fluid on day 2 and day 4 post challenge. LOD, limit of detection. Statistical significance in all the panels were determined using Wilcoxon rank-sum exact test. Horizontal bars are the group mean except in (J and K) where geometric mean is shown. Error bars indicate standard error of the mean. Asterisks show the statistical significance between the indicated group and CH65 control group: ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

See also [Figure S4](#), [S5](#), [S5](#), and [S6](#).

A continuación, examinamos el efecto de la infusión de Ab DH1052 que mejora la infección por NTD, Ab DH1050.1 neutralizante de NTD o control de Ab CH65 sobre la infección por SARS-CoV-2 en monos ([Leist et al., 2020b](#); [Rockx et al., 2020](#)). Los macacos Cynomolgus fueron infundidos con 10 mg de Ab por kg de peso corporal y 3 días después desafiados intranasal e intratraquealmente con 10⁵ PFU del SARS-CoV-2 ([Figura 5G](#)). La infusión de Ab humano dio lugar a concentraciones circulantes que oscilaban entre 11 y 238 µg/ml en suero en el día 2 después del desafío ([Figuras 5H y 5I](#)). Los sueros con DH1050.1 neutralizaron el pseudovirus del SARS-CoV-2 y el virus competente para la replicación, mientras que el suero que contenía DH1052 o CH65 no neutralizó ([Figuras 5J y 5K](#)). Cuatro de los 5 macacos que recibieron DH1052 tenían una inflamación pulmonar comparable para controlar los macacos con infusión de CH65 4 días después de la infección ([Figuras 5L y S5 A](#)). Sin embargo, un macaco (BB536A) administrado DH1052 mostró aumento de la inflamación mononuclear perivascular, edema perivascular y alveolar ([Figura S5B](#)), y múltiples citoquinas BAL reguladas al alza ([Tabla S5](#)). El análisis inmunohistológico demostró la infiltración alveolar y perivascular de macrófagos de tipo M2 tanto en mono BB536A como en mono control BB785E ([Figuras S5C–S5E](#)). Por el contrario, los macacos a los que se les administró DH1050.1, un Ab NTD neutralizante, tuvieron una menor inflamación pulmonar ([Figuras 5L y](#)

yS5A)S5A) y menos macrófagos infiltrantes (Figuras S5C–S5E). La infusión de DH1050.1 o DH1052 redujo el antígeno de la nucleocápside viral (Figuras 5M y yS5A),S5A), gen de la envoltura (E) sgRNA, y gen de la nucleocápside (N) sgRNA en el BAL (Figuras 5N y 5O). En el líquido de hisopo nasal, DH1050.1 y DH1052 redujeron el sgRNA del gen E y N en macacos, siendo la reducción significativa al neutralizar Ab DH1050.1 (Figuras 5P–5Q).

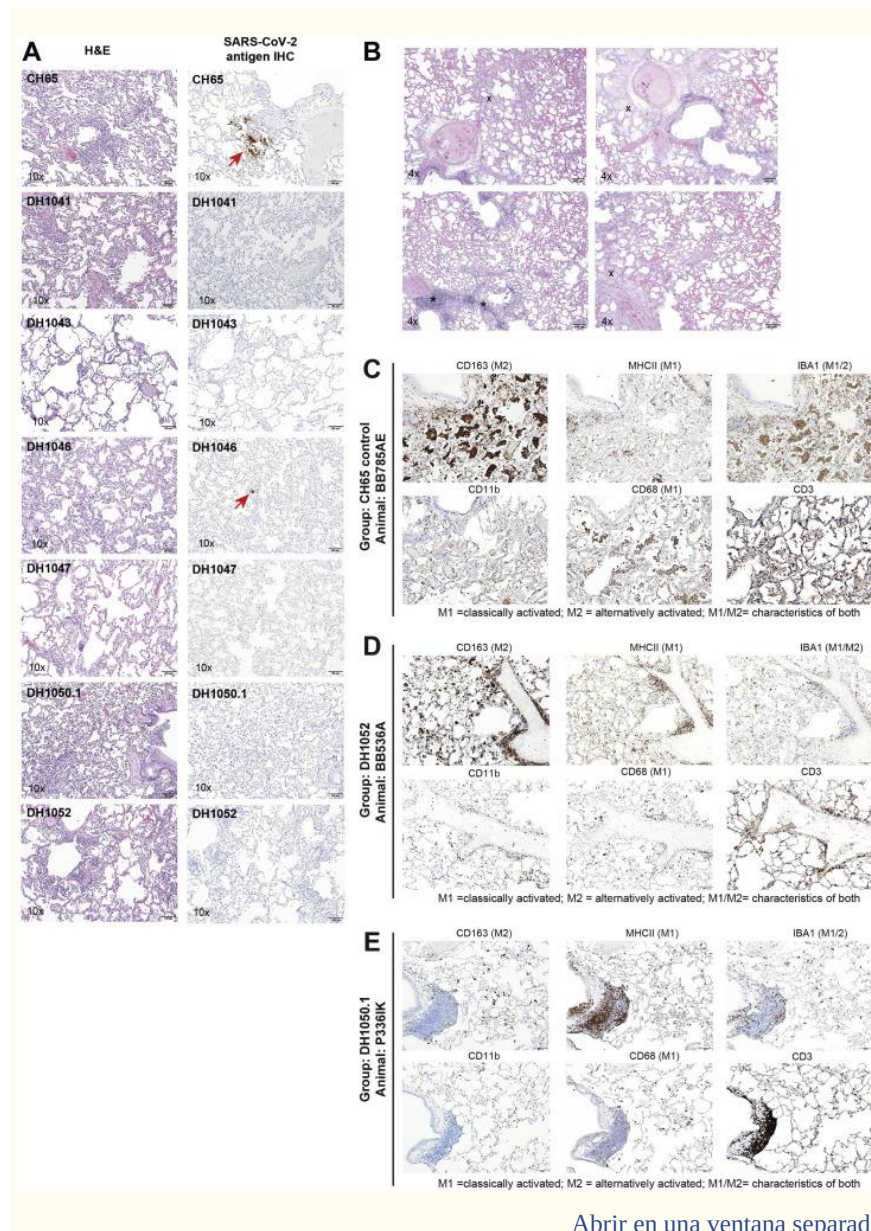


Figura S5

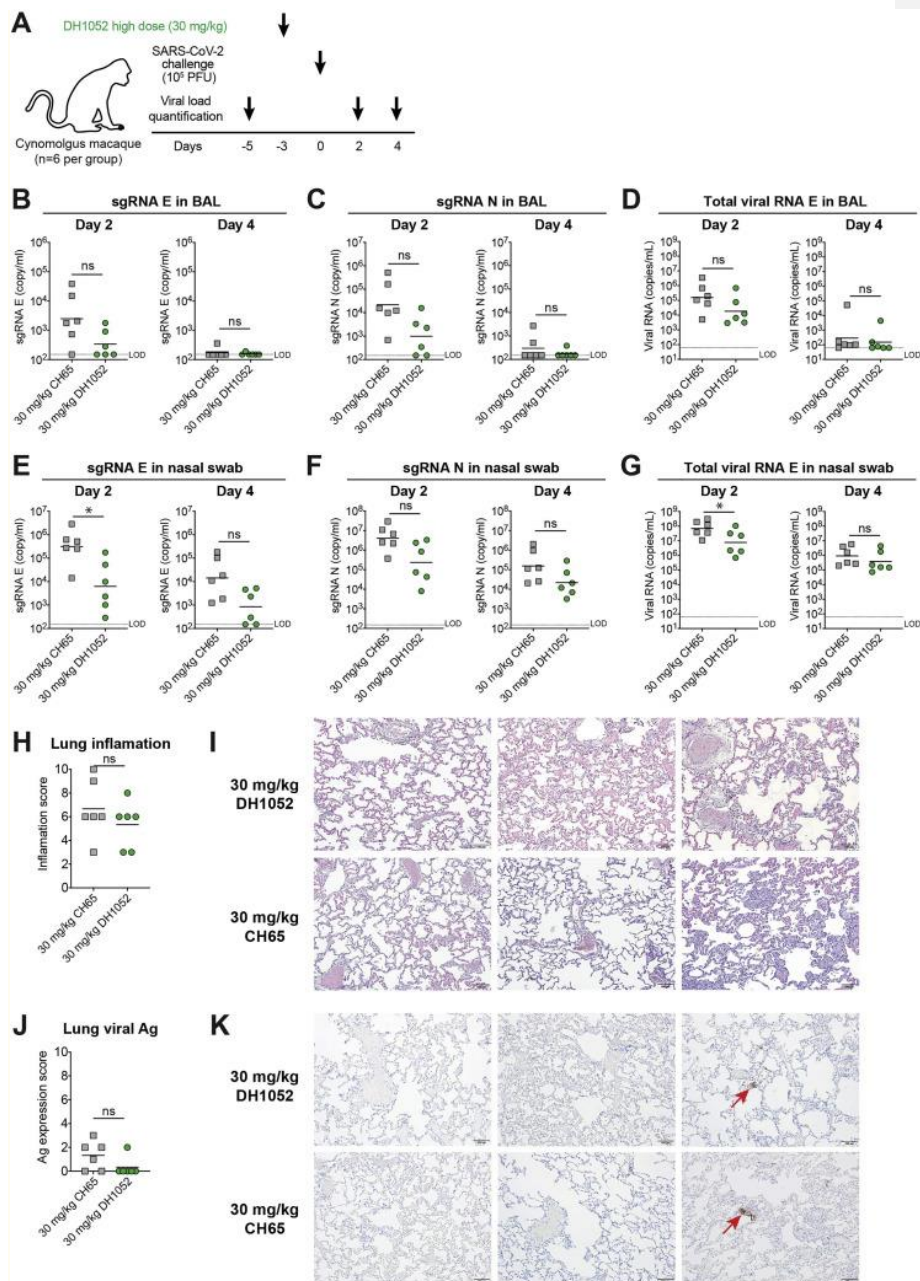
Histopatología pulmonar de macacos cynomolgus tratados con Ab y SARS-CoV-2, relacionados con [Figuras 5 y 7](#)

(A) Imágenes representativas de tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y tinción de inmunohistoquímica del antígeno del SARS-CoV-2 (IHC) de cada grupo. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 10x. Las imágenes de esta figura son representativas de la gravedad media de los procesos patológicos observados y registrados durante la evaluación microscópica. Las flechas rojas indican focos de infección por SARS-CoV-2.

(B) Después de la evaluación microscópica de DH1052, 1 animal (BB536A) de 5 animales en este grupo exhibió características histológicas que fueron sustancialmente más graves que el resto de la cohorte y pueden sugerir algún grado de mejora de la enfermedad mediada por Ab. Las características se caracterizaron por una inflamación mononuclear perivascular prominente (*) y una cantidad sustancial de edema perivascular y alveolar (líquido; X). Estos hallazgos sugieren un proceso vasocéntrico con cierto grado de permeabilidad vascular alterada. Los 4 animales restantes en el grupo DH1052 tuvieron cambios inflamatorios que variaron de gravedad mínima a moderada y más infiltrados fueron mixtos y predominantemente polimorfonucleares con menor afectación de células mononucleares y presentes en los espacios alveolares.

(C-E) Expresión de marcadores de activación de macrófagos en tejidos pulmonares de macacos. Un animal del grupo de control CH65 (C), el animal tratado con DH1052 (BB536A) que exhibió una inflamación pulmonar sustancialmente más grave (D) y un animal del grupo NTD NAb DH1050.1 (E) fueron seleccionados para la tinción de inmunohistoquímica (IHC). La tinción inmunohistoquímica se realizó utilizando MHCII, CD68, IBA1 y CD163 para detectar macrófagos activados clásicamente (M1) y/o macrófagos activados alternativamente (M2). CD11b es un marcador de macrófagos/monocitos y CD3 es un marcador de células T. Todas las imágenes tienen un aumento de 10x; barras de escala = 100µm.

Dado que la mejora de la infección *in vitro* mediada por DH1052 aumentó a medida que aumentaba la concentración de Ab ([Figuras 1D y 1E](#)), infundimos 6 macacos cynomolgus adicionales con 30 mg/kg de DH1052 o CH65 control Ab ([Figura S6 A](#)). La infusión de DH1052 suprimió la carga viral de BAL ([Figuras S6B–S6D](#)), redujo significativamente la replicación del virus en muestras de hisopos nasales ([Figuras S6E–S6G](#)), y no mostró inmunopatología mejorada ni secreción de citoquinas ([Figuras S6H–S6K](#); [Cuadro S5](#)). Por lo tanto, con dosis altas (30 mg / kg) de DH1052 Ab, no hubo mejora de la infección. Estos resultados sugirieron que la patología pulmonar observada en el mono BB536A era rara y puede no haber sido causada por la infusión de Ab.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S6

Las dosis altas de NTD que mejoran Ab DH1052 no mejoran la replicación del SARS-CoV-2 o la enfermedad *in vivo*, relacionada con [Figura 5](#)

(A) Diagrama del diseño del estudio de macacos que muestra que los macacos cynomolgus (n = 5 por grupo) fueron infundidos con dosis altas (30 mg / kg de peso corporal) DH1052 o un control irrelevante CH65 Ab 3 días antes de 10⁵ PFU del desafío del SARS-CoV-2 a través de vías intranasales e intratraqueales. La carga viral, incluido el ARN viral y el ARN subgenómico (SGRNA), se midió en los puntos de tiempo indicados antes y después del desafío. Los pulmones se cosecharon el día 4 después del desafío para el análisis de histopatología.

(B-D) SARS-CoV-2 (B) Gen E sgRNA, (C) Gen N sgRNA y (D) E gen ARN viral total en lavado broncoalveolar (BAL) en el Día 2 y Día 4 post desafío.

(E-G) SARS-CoV-2 (E) gen E sgRNA, (F) gen N gen sgRNA y (G) E gen RNA total viral en hisopo nasal en el día 2 y día 4 post desafío.

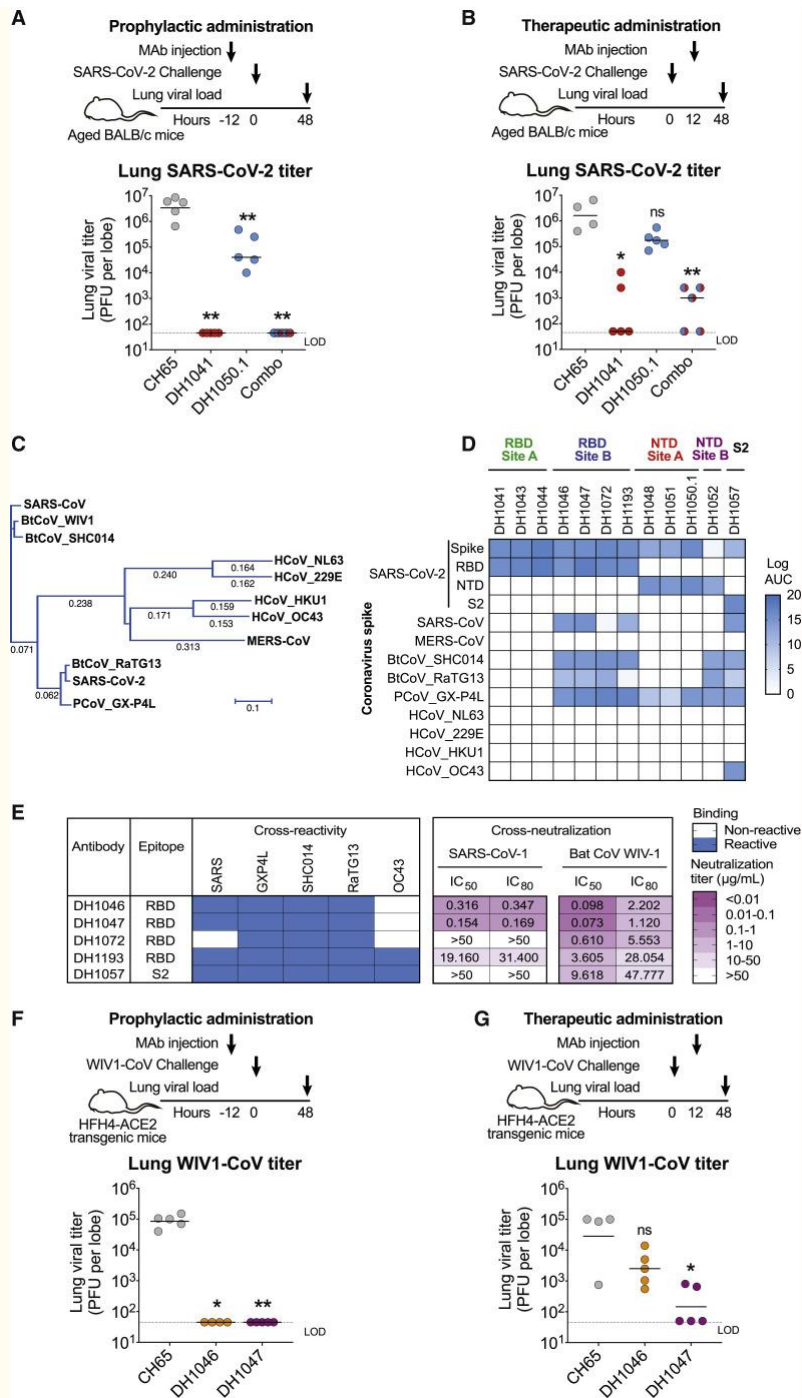
(H-I) Lung inflammation. Sections of the left caudal (Lc), right middle (Rm), and right caudal (Rc) lung were evaluated and scored for the presence of inflammation by hematoxylin and eosin (H&E) staining. (H) Summary of inflammation scores. Symbols indicate the sums of Lc, Rm, and Rc scores in each animal. (I) Representative images of lung H&E staining.

(J-K) Immunohistochemistry (IHC) staining for the presence of SARS-CoV-2 nucleocapsid in lungs. (J) Summary of IHC scores. Symbols indicate the sums of Lc, Rm, and Rc scores in each animal. (K) Representative images of lung IHC staining. Red arrows indicate SARS-CoV-2 infection foci.

LOD, limit of detection. Horizontal bars are the group mean except in (C) where group geometric mean is shown. Statistical significance in all the panels were determined using Wilcoxon rank sum exact test. Asterisks show the statistical significance between the indicated group and CH65 control group: ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Los ABS RBD dependientes de FcγR *e in vitro* que mejoran la infección no mejoran la infección por SARS-CoV-2 en ratones

A continuación, utilizamos un modelo de ratón de adquisición del SARS-CoV-2 para investigar la relevancia *in vivo* del Abs neutralizante de RBD que también medió la mejora de la infección *in vitro* (Figuras 6 A y 6B). Los ratones BALB/c envejecidos fueron inyectados intraperitonealmente con 300 µg de Ab y desafiados con un aislado de 2AA MA adaptado al ratón al SARS-CoV-2 12 h más tarde (Dinnon et al., 2020). Los ratones recibieron Ab DH1041 que mejora la infección *in vitro*, Ab DH1050.1 que no mejora la infección o una combinación de Abs. La administración de DH1041 solo o en combinación con DH1050.1 protegió a todos los ratones del virus infeccioso detectable en los pulmones 48 h después del desafío (Figura 6A). En el contexto del tratamiento terapéutico, la administración de DH1041 solo o en combinación con DH1050.1 12 h después del desafío del SARS-CoV-2 redujo significativamente los títulos de virus infecciosos pulmonares (Figura 6B). Por lo tanto, mientras que RBD Ab DH1041 podría mediar la mejora de la infección *in vitro* dependiente de FcγR, protegió a los ratones de la infección por SARS-CoV-2 cuando se administró profiláctica o terapéuticamente.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 6

Los ABS RBD que median la mejora de la infección dependiente de FcγR *in vitro* protegen a los ratones del SARS-CoV-2 o del desafío WIV1-CoV de murciélago

(A y B) Protección de ratones BALB/c (n = 5 por grupo) de la administración de RBD y/o NTD Ab adaptada al ratón (SARS-CoV-2 2AA MA) mediante (A) administración profiláctica o (B) terapéutica de RBD y/o NTD Ab. Ab CH65 sirvió como control negativo. Los títulos de virus infecciosos en el pulmón se examinaron 48 h después de la infección.

(C) Árbol de máxima probabilidad de secuencias de aminoácidos Spike para coronavirus humanos, murciélagos y pangolín.

(D) Título monoclonal de unión a RBD, NTD y S2 Ab ELISA para ectodominios solubles de proteína S de coronavirus humanos y animales. Los títulos son el área de registro bajo la curva (AUC).

(E) Títulos de neutralización cruzada de SARS-CoV y murciélago WIV1-CoV para RBD y S2 Abs de reactividad cruzada.

(F y G) Protección de ratones transgénicos HFH4-hACE2 (n = 5 por grupo) del desafío WIV1-CoV de murciélagos relacionados con el SARS mediante la administración de RBD Ab profiláctica o (B) terapéutica. Los títulos virales pulmonares se examinaron a las 48 h después de la infección. La significación estadística en todos los paneles se determinó mediante la prueba exacta de la suma de rangos de Wilcoxon. Las barras horizontales son la media del grupo. Los asteriscos muestran la significación estadística entre el grupo indicado y el grupo control CH65: ns, no significativo, *p < 0,05, **p < 0,01.

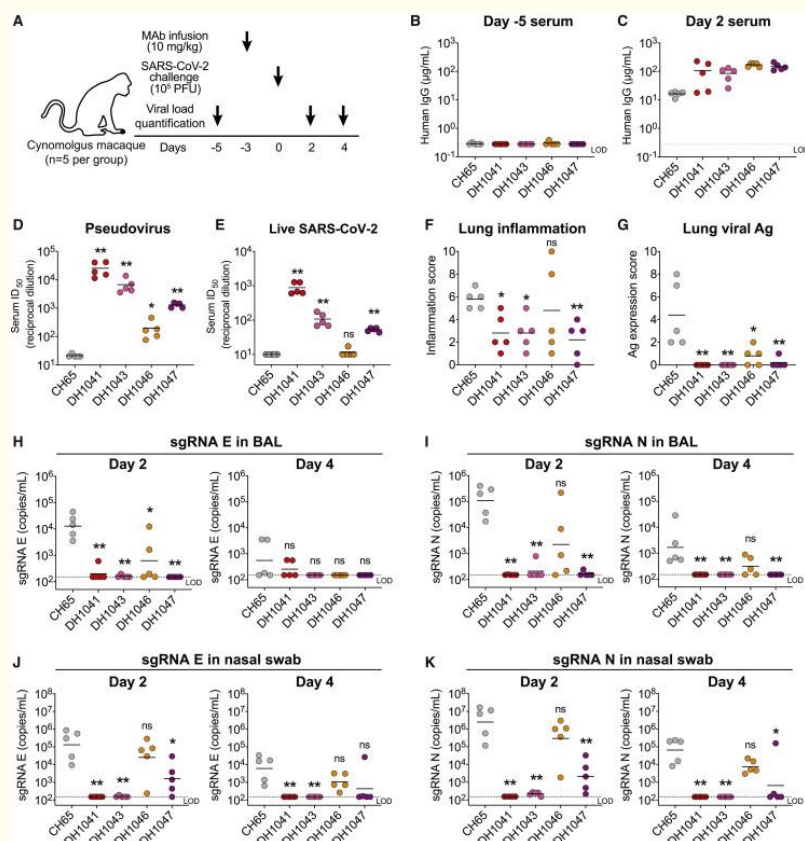
DH1046 y DH1047 son RBD Abs que neutralizan el SARS-CoV, el SARS-CoV-2 y el murciélago WIV1-CoV (Figuras 2UN A, S2A, S2A, S2B, S2I–S2L y y6C–6E). 6C–6E). Ambos RBD Abs mediaron por FcγR, mejora *in vitro* de la infección por SARS-CoV-2 (Figuras 1F–1L). Se evaluó la capacidad de DH1046 o DH1047 para mejorar o proteger contra la infección por WIV1-CoV en murciélagos en ratones transgénicos HFH4-ACE2 (Figuras 6F y 6G). Los ratones a los que se les administró DH1046 o DH1047 antes del desafío no tenían virus infecciosos detectables en el pulmón, mientras que los ratones administrados con IgG de control tenían un título medio de 84.896 PFU por lóbulo pulmonar (Figura 6F). La administración de DH1047 después del desafío eliminó el virus infeccioso detectable en el pulmón en 3 de 5 ratones (Figura 6G). La administración terapéutica de DH1046 redujo los títulos de virus infecciosos 10 veces en comparación con la IgG de control negativo (Figura 6G). Por lo tanto, DH1046 y DH1047 no mejoraron la infección *in vivo*, sino que protegieron a los ratones de la infección por coronavirus de murciélago relacionada con el SARS.

Abs RBD que mejoran la infección *in vitro* en primates no humanos desafiados por sars-CoV-2

Finalmente, se evaluó el realce de la infección por RBD Ab en macacos *cynomolgus* (Figuras 7 A). Después de la infusión de Ab a 10 mg/kg de peso corporal, las concentraciones séricas de IgG humana alcanzaron 11–228 µg/ml en el día 2 después del desafío (Figuras 7B y 7C) y exhibió una amplia gama de potencias de

Comentado [M14]: El hecho de que haya tantas posibilidades a favor y en contra de que los autoanticuerpos faciliten la infección, puede ser motivo que la estructura espacial de las proteínas llamese epitope o paratope, pueden cambiar su grado de afinidad, según la concentración de hidrogeniones (variación del pH) como resultado de la etapa del proceso inflamatorio, o la concomitancia de enfermedad metabólica preexistente, como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad autoinmune. O cualquier enfermedad que predisponga al huésped a una variación de pH intracelular y del medio interno, facilitando un cambio de la conformación espacial, que facilite o no facilite la infección. En pocas palabras el pH puede modificar la estructura espacial de las moléculas, facilitando la infección cuando desciende y evitándolo cuando sube? Porque la conformación espacial de estructuras químicas suelen ser pH dependientes. Y en esta enfermedad un medio ligeramente alcalino (mejora por la oxigenación, produce una mejora en el sistema inmune. COVID 19 TIENE LAS CARACTERÍSTICAS DE ENFERMEDAD METABÓLICA AGRAVADA POR FEEDBACK NEGATIVO.. DADO QUE EL AZUL DE METILENO FAVORECE LA OXIGENACION MITOCONDRIAL AUMENTANDO EL PH INTRACELULAR Y MEJORANDO LA RESPUESTA INMUNE, COMO MUESTRAN LAS VARIACIONES ESPACIALES EN ESTE TRABAJO PERO NO LO VINCULAN A LAS VARIACIONES DE PH DEL MEDIO.

neutralización contra el SARS-CoV-2 (Figuras 7D y 7E). La infusión de RBD Ab DH1041, DH1043 o DH1047 resultó en una reducción de la inflamación pulmonar, antígeno viral pulmonar indetectable (Figuras 7F, 7G y yS5A).S5A), y reducción del SGRNA en las vías respiratorias superior e inferior (Figuras 7H–7K). RBD Ab DH1046, un Ab neutralizante más débil en comparación con DH1041, DH1043 o DH1047 (Figura 2A), no mejoró el SGRNA E o N en muestras de BAL o hisopo nasal (Figuras 7H–7K) pero protegió solo un subconjunto de monos infundidos. Dos monos con infusión de DH1046 habían aumentado las puntuaciones de inflamación pulmonar debido al aumento de las áreas totales de inflamación en comparación con los monos Ab de control (Figuras 7F y yS5A).S5A) pero no tenía evidencia de edema perivascular o alveolar ni evidencia de citoquinas BAL anormales (Tabla S5). Por lo tanto, estos dos animales tenían más pulmón involucrado con la infiltración inflamatoria de macrófagos, pero no tenían evidencia patológica de fuga vascular. Comparando el grupo DH1046 con el grupo IgG control, se redujo el antígeno de nucleocápside viral en el pulmón (Figuras 7G y yS5A).S5A). Por lo tanto, el Ab débilmente neutralizante solo limitó parcialmente la replicación del virus y la inflamación pulmonar.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 7

Los ABS RBD que median la mejora de la infección dependiente de FcγR *in vitro* protegen a los primates no humanos del desafío del SARS-CoV-2

(A) Cynomolgus macacos (n = 5 por grupo) RBD Ab SARS-CoV-2 diseño del estudio de desafío. DH1041, DH1043, DH1046, DH1047 o un CH65 irrelevante fueron infundidos en macacos.

(B y C) Concentraciones séricas de IgG humana en el día -5 (B) y el día 2 (C).

(D y E) Los títulos de neutralización sérica del día 2 se muestran como la dilución sérica recíproca que inhibe el 50% (ID₅₀) de (D) replicación pseudotipada del SARS-CoV-2 en células 293T/ACE2 o (E) replicación del SARS-CoV-2 en células Vero.

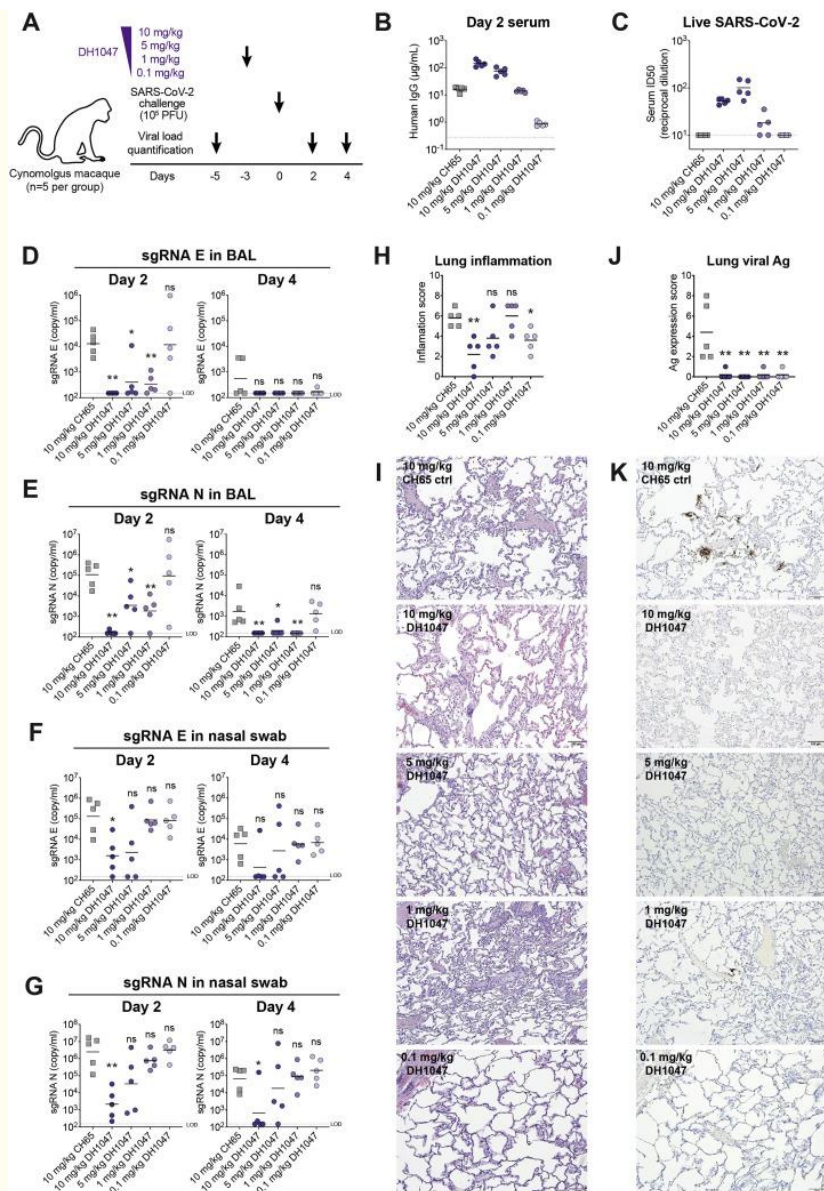
(F y G) Histopatología pulmonar para (F) inflamación por tinción de H&E y (G) presencia de nucleocápside de SARS-CoV-2 por tinción de IHC 4 días después del desafío.

(H-K) Carga viral cuantificada como sgRNA del gen E del SARS-CoV-2 y sgRNA del gen N en el lavado broncoalveolar (H e I) (BAL) o (J y K) líquido de hisopo nasal el día 2 y el día 4 después del desafío.

La significación estadística en todos los paneles se determinó mediante la prueba exacta de la suma de rangos de Wilcoxon. Las barras horizontales son la media del grupo excepto en (D y E) donde se muestra la media geométrica del grupo. Los asteriscos muestran la significación estadística entre el grupo indicado y el grupo control CH65: ns, no significativo, *p < 0,05, **p < 0,01.

Consulte también [la figura S4](#), [S5](#), [S5y](#) [S7](#).

La mejora de la infección *in vitro* por RBD Abs depende de la concentración de Ab, con niveles más bajos de Ab que muestran la mayor magnitud de mejora de la infección (Figura1G). Por lo tanto, realizamos un estudio de infusión pasiva adicional con una serie de diferentes concentraciones de DH1047 (FiguraS7 A). Los macacos Cynomolgus fueron infundidos con 5, 1 o 0.1 mg de DH1047 por kg de peso corporal, lo que resultó en un amplio rango de concentraciones de DH1047 en suero (FigurasS7B yS7C). Sin embargo, ninguno de los grupos de macacos tuvo una mejor replicación del virus (aunque un mono en el grupo de 0,1 mg/kg tenía un BAL sgRNA E y N más altos que los controles) (FigurasS7D-S7G), inflamación pulmonar (Figuras S7H yS7I), antígeno viral pulmonar (Figuras S7J-S7K), o citoquinas inflamatorias BAL más altas (TablaS5) en comparación con el grupo IgG de control.



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura S7

Las diferentes dosis de un tratamiento de ab DH1047 de neutralización cruzada no mejoran la replicación del SARS-CoV-2 *in vivo*, relacionadas con [Figura 7](#)

(A) Diagrama del diseño del estudio del macaco. Los macacos Cynomolgus (n = 5 por grupo) fueron infundidos con DH1047 a la dosis de 10 mg/kg, 5 mg/kg, 1 mg/kg, 0,1 mg/kg de peso. Los macacos tratados con 10 mg/kg de peso de DH65 Ab se establecieron como el

grupo de control. Tres días después de la infusión, 10^5 PFU del desafío del SARS-CoV-2 a través de vías intranasales e intratraqueales. La carga viral, incluido el ARN viral y el ARN subgenómico (SGRNA), se midió en los puntos de tiempo indicados antes y después del desafío. Los pulmones se cosecharon el día 4 después del desafío para el análisis de histopatología.

(B) Concentraciones séricas de IgG humana en el día 2.

(C) Títulos de neutralización sérica de día 2 mostrados como la dilución sérica recíproca que inhibe el 50% (ID_{50}) de replicación del SARS-CoV-2 en células Vero.

(D-E) SARS-CoV-2 (D) E gen sgRNA y (E) N gen sgRNA en lavado broncoalveolar (BAL) en el día 2 y el día 4 post desafío.

(F-G) SARS-CoV-2 (F) E gen sgRNA y (G) N gen sgRNA en hisopo nasal en el día 2 y día 4 después del desafío.

(H-I) Inflamación pulmonar. Se evaluaron secciones del pulmón caudal izquierdo (Lc), medio derecho (Rm) y caudal derecho (Rc) y se calificaron para la presencia de inflamación por tinción de hematoxilina y eosina (H&E). (H) Resumen de las puntuaciones de inflamación. Los símbolos indican las sumas de las puntuaciones Lc, Rm y Rc en cada animal. (I) Imágenes representativas de tinción pulmonar de H&E.

(J-K) Tinción inmunohistoquímica (IHC) para la presencia de nucleocápside del SARS-CoV-2 en los pulmones. (J) Resumen de los puntajes de IHC. Los símbolos indican las sumas de las puntuaciones Lc, Rm y Rc en cada animal. (K) Imágenes representativas de la tinción pulmonar de IHC. Las flechas rojas indican focos de infección por SARS-CoV-2.

LOD, límite de detección. Las barras horizontales son la media del grupo excepto en (C) donde se muestra la media geométrica del grupo. La significación estadística en todos los paneles se determinó mediante la prueba exacta de la suma de rango de Wilcoxon. Los asteriscos muestran la significación estadística entre el grupo indicado y el grupo control CH65: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En general, 45 de los 46 monos con infusión de Ab que mejoran el pico no mostraron una mejor replicación del virus *in vivo*, mientras que 3 de los 46 monos tratados con Ab exhibieron una mejora de la patología pulmonar, y 1 de 46 monos tratados con Ab tenían edema alveolar y perivascular con citoquinas inflamatorias BAL elevadas. En el caso de este último mono, un estudio de seguimiento con 3 veces la dosis inicial de DH1052 Ab no confirmó que la infusión de DH1052 dio lugar a una mejor patología pulmonar después del desafío del SARS-CoV-2.

[Vete a:](#)

Discusión

Aquí, evaluamos la mejora de la infección por SARS-CoV-2 Abs y observamos dos tipos diferentes de mejora de la infección *in vitro*. En primer lugar, RBD Abs medió ade clásico que requirió Fc γ Rs y Ab Fc para la absorción del virus ([Lee et al., 2020](#)). Estudios previos han demostrado que la absorción de MERS-CoV o SARS-CoV ha sido mediada principalmente por Fc γ RIIa en la superficie de los macrófagos ([Bourmazos et al., 2020](#); [Wan et al., 2020](#); [Yip et al., 2016](#)). Por el contrario, identificamos que el SARS-CoV-2 RBD Abs utilizó Fc γ RIIb o Fc γ RI. En segundo lugar, el NTD Abs no neutralizante medió

la mejora de la infección independiente de FcγR en dos tipos diferentes de células fcγR negativas que expresan ACE2. El mecanismo de realce *in vitro* FcγR-negativo sigue sin estar claro, pero un estudio previo ha informado que los abs NTD seleccionados pueden mejorar la unión S a ACE2 ([Liu et al., 2020b](#)).

Los macrófagos y otros fagocitos son las células diana que toman el MERS-CoV, lo que lleva a la mejora de la infección ([Hui et al., 2020](#); [Wan et al., 2020](#); [Zhou et al., 2014](#)). Por el contrario, ni el SARS-CoV ni el SARS-CoV-2 infectan productivamente a los macrófagos ([Bournazos et al., 2020](#); [Hui et al., 2020](#); [Yip et al., 2016](#)). Sin embargo, un estudio reciente demostró que los macrófagos alveolares que albergan ARN del SARS-CoV-2 producen quimioatráctas de células T que conducen a la producción de interferón de células T (IFN)-γ que, a su vez, estimula la liberación de citoquinas inflamatorias de los macrófagos alveolares ([Grant et al., 2021](#)). Se desconoce por qué se desconocía la patología pulmonar grave y la producción de citoquinas inflamatorias en solo 1 de 46 monos, pero puede relacionarse con diferencias específicas del huésped que regulan la producción de citoquinas inflamatorias ([Bastard et al., 2020](#); [Zhang et al., 2020](#)). Es importante tener en cuenta que el único mono que desarrolló edema alveolar y perivascular y citoquinas inflamatorias BAL elevadas podría haber sido causado por la mejora ab de la enfermedad o podría haber sido debido a factores desconocidos que causaron una enfermedad más grave en animales BB536A que no estaban relacionados con la administración de DH1052. El hecho de que ninguno de los 6 animales infundidos con una dosis más alta (30 mg / kg) de DH1052 tuviera una enfermedad pulmonar mejorada apoya la hipótesis de que la patología pulmonar puede haber sido un caso grave de enfermedad pulmonar COVID-19 no relacionada con la infusión de Ab.

Estudios previos con Abs inducidos por vacuna contra el SARS-CoV también han demostrado una mejora de la infección *in vitro*, pero no una mejora de la infección *in vivo* en hámsteres ([Kam et al., 2007](#)). Una explicación para estos resultados puede ser que el Abs que mejora *in vitro* puede tener la capacidad de suprimir la replicación del SARS-CoV-2 *in vivo* a través de funciones efectoras Ab no neutralizantes mediadas por FcR ([Bournazos et al., 2020](#); [Schäfer et al., 2021](#)). Un estudio reciente en un modelo de adquisición de ratón sars-CoV-2 sugirió que las funciones efectoras Fc contribuyen a la actividad protectora de abs neutralizantes del SARS-CoV-2 C104, C002 y C110 ([Schäfer et al., 2021](#)). Thus, Ab effector functions may contribute to the outcome *in vivo* but not be accounted for in SARS-CoV-2 enhancement or neutralization assays *in vitro*. Consistent with previous findings for human IgG ([Dekkers et al., 2017](#)), we observed that DH1052 Ab can bind to select murine FcγRs.

In vivo, los trímeros del SARS-CoV-2 S circulan en presencia de una respuesta Ab policlonal. Observamos que las combinaciones bivalentes y trivalentes de Fabs de RBD y Abs neutralizantes de NTD pueden reconocer el mismo protómero del trímero S. Especulamos dada la dirección del C-termini de los Fabs y el modelado molecular que tres IgG dirigidos a epítomos distintos pueden ser capaces de interactuar con el mismo protómero, si la región de la bisagra IgG es lo suficientemente flexible y el RBD está en una conformación óptima hacia arriba para el compromiso simultáneo. La participación simultánea de RBD y NTD Abs podría mejorar el sinergismo de la neutralización ([Zost et al., 2020a](#)) y avidéz de los complejos inmunes para FcγRs en células efectoras ([Nagashima et al., 2011](#); [Nagashima et al., 2008](#); [Wang](#)

et al., 2017). Además, estos resultados indican tres epítomos que los profilácticos de Ab podrían dirigirse a RBD y NTD para ocupar los trímeros S con múltiples IgG.

Limitaciones del estudio

Aunque se observó una inmunopatología mejorada rara en monos, es difícil predecir si este fenómeno ocurrirá en el contexto de la infección humana o la vacunación. Además, los anticuerpos RBD y NTD fueron el foco de este estudio; por lo tanto, si los anticuerpos de otras especificidades median la ADE justifica un estudio adicional. Además, el modelo de macaco tiene un curso de infección bastante corto; por lo tanto, los efectos del anticuerpo SARS-CoV-2 sobre la infección persistente por SARS-CoV-2 no se examinaron aquí.

Finalmente, la administración de sueros convalecientes de COVID-19 a más de 35,000 pacientes con COVID-19 ha demostrado que el tratamiento es seguro y no está asociado con una enfermedad mejorada (Joyner et al., 2020). De mayor importancia es que tanto los ensayos de eficacia de la vacuna pfizer/BioNTech como los de modernas nanopartículas lipídicas de ARNm (LNP) se han completado y han demostrado ~95% de eficacia de la vacuna (Jackson et al., 2020; Polack et al., 2020). Que el ensayo de eficacia de la vacuna MODERNA mRNA-LNP COVID-19 tuvo 30 casos graves de COVID-19, todos en el grupo placebo (Baden et al., 2021), demostró que, si la ADE de infección o patología pulmonar ocurrirá en humanos con vacunación, será raro. Un estudio reciente demostró que el nivel de Ab neutralizante subóptimo es un predictor significativo de la gravedad del SARS-CoV-2 (García-Beltrán et al., 2020). Por lo tanto, incluso con la rareza de la patología pulmonar grave asociada con la presencia de Ab anti-pico en los estudios de modelos animales informados aquí, será importante continuar monitoreando la vacunación en curso contra COVID-19 para detectar la posibilidad de una enfermedad mejorada asociada a la vacuna cuando se inducen títulos de Ab neutralizantes subóptimos (Haynes et al., 2020).

[Vete a:](#)

STAR★Métodos

Tabla de recursos clave

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Anticuerpos		

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
PE-Cy5 Ratón Anti-Humano CD3, Clon# HIT3a	BD Biociencias	Cat#555341; RRID: AB_10698936
BV605 Ratón Anti-Humano CD14, Clon# M5E2	Biolegenda	Cat#301834, RRID: AB_2563798
BV570 Ratón Anti-Humano CD16, Clon # 3G8	Biolegenda	Cat# 302035, RRID: AB_2632790
APC-Cy7 Ratón Anti-Humano CD19, Clon# SJ25C1	BD Biociencias	Cat# 557791, RRID: AB_396873
FITC Ratón Anti-Humano IgD, Clon# 1A6-2	BD Biociencias	Cat# 555778, RRID: AB_396113
PerCp-Cy5.5 Ratón Anti-Humano IgM, Clon# G20-127	BD Biociencias	Cat# 561285, RRID: AB_10611998
PE-CF594, Ratón Anti-Humano CD10, Clon# HI10A	BD Biociencias	Cat# 562396, RRID: AB_11154416
PE-Cy5 Ratón Anti-Humano CD235a, Clon# GA-R2	BD Biociencias	Cat# 559944, RRID: AB_397387

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
PE-Cy7 Ratón Anti-Humano CD27, Clon# O323	eBiociencia electrónica	Cat# 25-0279, RRID: AB_1724039
APC-AF700 Ratón Anti-Humano CD38, Clon# LS198-4-2	Beckman Coulter	Gato# B23489 , RRID: NA
SARS-CoV/SARS-CoV-2 Spike Ab, Clon# D001	Sino Biológico	#40150 Cat-D001
Virus antigripal hemaglutinina humana IgG CH65	(Whittle et al., 2011)	NA
Conejo policloonal SARS-CoV-2 nucleocápside Ab	GeneTex	Cat #GTX135357, RRID: AB_2868464
Rata anti-humana CD3, Clon# CD3-12	Bio-Rad	Cat #MCA1477, RRID: AB_321245
Conejo antihumano Iba1 policlogonal Ab	Wako	Cat# 019-19741, RRID: AB_839504
Conejo anti-humano CD68 policlogonal Ab	Sigma-Millipore	Cat# HPA048982, RRID: AB_2680587

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Conejo anti-humano CD163, Clon# EPR19518	Abcam	Cat# ab182422, RRID: AB_2753196
Ratón anti-humano HLA-DP/DQ/DR, Clon# CR3/43	Dako	Cat# M0775, RRID: AB_2313661
Conejo anti-humano CD11b, Clon# EP1345Y	Abcam	Cat# ab52478, RRID: AB_868788
HRP cabra anti-humana IgG	SouthernBiotech	Cat #2040-05, RRID: AB_2795644
HRP cabra anti-conejo IgG	Abcam	Cat #ab97080, RRID: AB_10679808
Biotina ratón anti-humana IgG Fc, Clon# H2	Biotechnología del Sur	Cat# 9042-08, RRID: AB_2796608

Cepas bacterianas y de virus

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Virus pseudotipado SARS-CoV-2 D614G	(Korber et al., 2020)	NA
Virus SARS-CoV-2, Aislado USA-WA1/2020	Recursos de BEI	Gato #NR-52281
SARS-CoV-2 nanoLuc virus	(Hou et al., 2020)	NA
SARS-CoV nanoLuc virus	(Sheahan et al., 2017)	NA
WIV1-CoV nanoLuc virus	(Menachery et al., 2016)	NA
SARS-CoV-2 moues-adapted virus 2AA MA	(Dinnon et al., 2020)	NA
SARS-CoV-2 moues-adapted virus MA10	(Leist et al., 2020a)	NA

Biological samples

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Plasma, PBMCs, nasal swabs and bronchoalveolar lavage (BAL) from macaques	This paper	NA
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
LIVE/DEAD Fixable Red Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# L34972
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen	Cat #18080085
dNTP Set, PCR Grade	New England Biolabs	Cat # N0447L
UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen	Cat #10977
GeneLink Random Hexamer Primers	GeneLink	Cat #26-4000-03

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
AmpliTaq Gold 360 Mastermix	Thermo Fisher Scientific	Cat #4398881
Expi293 media	Invitrogen	Cat #A1435102
Expifectamine	Life Technologies	Cat #A14524
Protein A beads	Pierce	Cat #PI-20334
MfeI-HF	New England Biolabs	R3589L
MluI-HF	New England Biolabs	R3198L
SureBlue Reserve tetramethylbenzidine substrate	KPL	Cat #5120-0081
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	ThermoFisher	4444434
QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit	QIAGEN	937055

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Takara	740609.5
MEGAscript T7 Transcription Kit	ThermoFisher	AM1334
MEGAclear Transcription Clean-Up Kit	ThermoFisher	AM1908
Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent	Promega	Cat# E1531
Background Reducing Ab Diluent	Agilent	Cat# S3022
PowerVision Poly-HRP anti-Rabbit IgG IHC Detection Systems	Leica	Cat# PV6121
Human ACE2 soluble protein	(Edwards et al., 2021)	NA
SARS-CoV-2 Spike S1+S2 ectodomain (ECD)	Sino Biological	Cat #40589-V08B1
SARS-CoV-2 Spike S2 ECD	Sino Biological	Cat #40590-V08B

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
SARS-CoV-2 Spike RBD from insect cell sf9	Sino Biological	Cat #40592-V08B
SARS-CoV-2 Spike RBD from mammalian cell 293	Sino Biological	Cat #40592-V08H
SARS-CoV Spike Protein DeltaTM	BEI Resources	Cat #NR-722
SARS-CoV WH20 Spike RBD	Sino Biological	Cat #40150-V08B2
SARS-CoV WH20 Spike S1	Sino Biological	Cat #40150-V08B1
MERS-CoV Spike S1+S2	Sino Biological	Cat #40069-V08B
MERS-CoV Spike S1	Sino Biological	Cat #40069-V08B1
MERS-CoV Spike S2	Sino Biological	Cat #40070-V08B

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
MERS-CoV Spike RBD	Sino Biological	Cat #40071-V08B1
SARS-CoV CL Protease protein	BEI Resources	Cat #30105
SARS-CoV Membrane (M) protein	BEI Resources	Cat #110705
SARS-CoV-2 Spike NTD	(Zhou et al., 2020b)	NA
SARS-CoV Spike RBD	(Hauser et al., 2020)	NA
MERS-CoV Spike RBD	(Hauser et al., 2020)	NA
SARS-CoV-2 Spike-2P	(Edwards et al., 2021)	NA
SARS-CoV-2 Spike-HexaPro	(Edwards et al., 2021)	NA

Critical commercial assays

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
MILLIPLEX MAP Non-Human Primate Cytokine/Chemokine Panel, 25-analyte multiplex bead array	Millipore	Cat #PRCYT2MAG40K
Bright-Glo Luciferase Assay System	Promega	Cat #2650
Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System	PerkinElmer Life Sciences	Cat #6066761
Nano-Glo Luciferase Assay System	Promega	Cat #N1150

Deposited data

Structure of SARS-CoV-2 S protein in complex with Receptor Binding Domain Ab DH1041	This paper	PDB: 7LAA , EMD- 23246
---	------------	--

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Structure of SARS-CoV-2 S protein in complex with Receptor Binding Domain Ab DH1047	This paper	PDB: 7LD1 , EMD- 23279
Structure of SARS-CoV-2 S protein in complex with N-terminal domain Ab DH1050.1	This paper	PDB: 7LCN , EMD- 23277
Structure of SARS-CoV-2 S protein in complex with N-terminal domain Ab DH1052	This paper	PDB: 7LAB , EMD- 23248
SARS-CoV-2 Spike Protein Trimer bound to DH1043 fab	This paper	PDB: 7LJR , EMD- 23400
Negative stain EM structure of Ab DH1041 Fab in complex with SARS-CoV-2 Hexapro spike	This paper	EMD-22920
Negative stain EM structure of Ab DH1042 Fab in complex with SARS-CoV-2 2P spike	This paper	EMD-22921
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1043 Fab en complejo con pico de SARS-CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22923

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1044 Fab en complejo con pico 2P del SARS-CoV-2	Este documento	EMD-22929
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1045 Fab en complejo con pico de SARS- CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22930
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1047 Fab en complejo con pico de SARS- CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22933
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1048 Fab en complejo con pico de SARS- CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22936
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1049 Fab en complejo con pico SARS-CoV- 2 2P	Este documento	EMD-22942
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1050.1 Fab en complejo con pico de SARS- CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22944

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1050.2 Fab en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22945
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1051 Fab en complejo con pico de SARS-CoV-2 Hexapro	Este documento	EMD-22946
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1053 Fab en complejo con pico 2P de SARS-CoV-2 en el estado 1-RBD-up	Este documento	EMD-22947
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1053 Fab en complejo con pico 2P de SARS-CoV-2 en el estado 3-RBD-down	Este documento	EMD-22948
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1054 Fab en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22951
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1055 Fab en complejo con pico 2P del SARS-CoV-2	Este documento	EMD-22952

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Estructura EM de tinción negativa de Ab DH1056 Fab en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22953
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1043 y DH1051 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22955
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1041 y DH1051 en complejo con pico 2P del SARS-CoV-2	Este documento	EMD-22956
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1043 y DH1047 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22957
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1047 y DH1051 en complejo con pico 2P del SARS-CoV-2	Este documento	EMD-22958
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1045 y DH1050.1 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22969

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1043 y DH1050.1 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22970
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1041 y DH1047 en complejo con pico 2P del SARS-CoV-2	Este documento	EMD-22971
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1050.1 y DH1053 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22984
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1043, DH1047 y DH1050.1 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22985
Estructura EM de tinción negativa de Ab Fabs DH1043, DH1047 y DH1051 en complejo con pico SARS-CoV-2 2P	Este documento	EMD-22986

Modelos experimentales: Líneas celulares

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
TZM-bl	NIH, ARRRP	#8129 de gatos
TZM-bl que expresa FcγRI	(Pérez et al., 2009)	NA
TZM-bl que expresa FcγRIIa	(Pérez et al., 2009)	NA
TZM-bl expresando FcγRIIb	(Pérez et al., 2009)	NA
TZM-bl expresando FcγRIII	(Pérez et al., 2009)	NA
Expi 293i	Invitrógeno	#14527 de gatos
293T/ACE2	(Korber et al., 2020)	NA
Vero E6	ATCC	Cat# CRL-1586

Experimental models: Organisms/strains

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
BALB/c mouse	Envigo	NA
<i>HFH4-hACE2</i> transgenic mice	(Menachery et al., 2016)	NA
Cynomolgus macaques	BioQUAL	NA

Oligonucleotides

VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGGAT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGCAT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGAAT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- GGTTCCTCTTTGTGGTGGC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGGGT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGATTTGGAGGAT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- AGGTTCTCTTTGTGGTGGCAG -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACATACTTTGTTCCACGCTC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ATGGACACACTTTGCTCCACGCT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACACACTTTGCTACACACTC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- CCGACGGGGAATTCTCACAG -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- CTGTTATCCTTTGGGTGTCTGCAC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- GGTGGCATTGGAGGGAATGTT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- CGAYGACCACGTTCCCATCT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- TAGTCCTTGACCAGGCAGC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- TAAAAGGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAAGAGGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAGAAGGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TACAAGGTGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TTAAAGCTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACATCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TTCTCCAAGGAGTCTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GCTATTTTAAAGGTGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAGCACCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- CCTCCACAGTGAGAGTCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCATC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGCAGCAGCAACAGGTGCCCA -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GCTCAGCTCCTGGGGCT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGAARCCCCAGCDCAGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTSTTSCTYTGGATCTCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTSGTGCTGGGYTCC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- GAGGCAGTTCCAGATTCAA -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CCTGGGCCCAGTCTGTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTCCTCASYCTCCTCACT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGCCTCCTATGWGCTGAC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GTTCTGTGGTTTTTCTGAGCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ACAGGGTCTCTCTCCCAG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ACAGGTCTCTGTGCTCTGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- CCCTCTCSCAGSCTGTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TCTTGGGCCAATTTTATGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATTCYCAGRCTGTGGTGAC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CAGTGGTCCAGGCAGGG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- AGGCCACTGTCACAGCT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VH1-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAG GTG CAGCTGGTRCAGTCTGGG -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VH2-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCA	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
GRGCACCTTGARGGAGTCTGGTCC –3’ (imprimación PCRb)		
Etiqueta VH3-Int 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG ACGAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGG –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VH4-Int tag 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGG –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VH5-Int 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACG ARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAG –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VH6-Int 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACC AGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCC –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
IgG-int 5’- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGCTCYT GGA –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
IgM-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGGAATT CTC ACAGGAGACGAGG -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
IgD-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGTGTCT GC ACCCTGATATGATGG -3' (IMPRIMACIÓN PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
IgA1-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGCTGGT GC TGCAGAGGCTCAG -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
IgA2-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGCTGGT G CTGTCGAGGCTCAG -3' (cartilla PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VK1-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACGA CATCCAGWTGACCCAGTCTC -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VK2-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAT ATTGTGATGACCCAGWCTCCAC -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VK3-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACG AAATTGTGTTGACRCAGTCTCCA -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VK4-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACG ACATCGTGATGACCCAGTCTC -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VK5-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC GAAACGACACTCACGCAGTCTC -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VK6-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CGAAATTGTGCTGACWCAGTCTCCA -3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Etiqueta VK7-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CGACATTGTGCTGACCCAGTCT -3' (imprimación PCRB)	Thermo Fisher Científico	NA
CK-int 5'- GGGAAGATGAAGACAGATGGT -3' (imprimación PCRB)	Thermo Fisher Científico	NA
VL1-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTTCCACTGGTG ACCAGTCTGTGYTGACKAGCC -3' (imprimación PCRB)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VL2-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CCAGTCTGCCCTGACTCAGCC -3' (imprimación PCRB)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VL3-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CTCYTATGAGCTGACWCAGCCAC -3' (imprimación PCRB)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VL3l-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
CTCTTCTGAGCTGCTGACTCAGGACCC –3' (imprimación PCRb)		
VL4ab-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGCYTGCTGACTCAATC –3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
Etiqueta VL4c-Int 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG ACCTGCCTGTGCTGACTCAGC –3' (cartilla PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VL5,9-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGSCTGTGCTGACTCAGCC –3' (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VL6-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTTCCACTGGT GACAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACT –3' (IMPRIMACIÓN PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VL7,8-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
CCAGRCTGTGGTGACYCAGGAG –3’ (imprimación PCRb)		
Etiqueta VL10-Int 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CCAGGCAGGGCWGACTCAG –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
CL-int 5’- GGGYGGGAACAGAGTGACC –3’ (imprimación PCRb)	Thermo Fisher Científico	NA
VH_Tag fwd seq 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC –3’ (Cebador de secuenciación)	Thermo Fisher Científico	NA
CK_int 5’- GGGAAGATGAAGACAGATGGT –3’ (Cebador de secuenciación)	Thermo Fisher Científico	NA
CL_int 5’- GGGYGGGAACAGAGTGACC –3’ (Imprimación de secuenciación)	Thermo Fisher Científico	NA
HV13221H_R474 5’- GCTGTGCCCCCAGAGGTG –3’ (Cebador de secuenciación)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGGAT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGCAT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGAAT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGTTCCTCTTTGTGGTGGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGACCTGGAGGGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACTGGATTTGGAGGAT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- AGGTTCTCTTTGTGGTGGCAG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACATACTTTGTCCACGCTC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACACACTTTGCTCCACGCT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGGACACACTTTGCTACACACTC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CCGACGGGGAATTCTCACAG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTGTTATCCTTTGGGTGTCTGCAC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- GGTGGCATTGGAGGGAATGTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CGAYGACCACGTTCCCATCT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAGTCCTTGACCAGGCAGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAAAAGGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAAGAGGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TAGAAGGTGTCCAGTGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- TACAAGGTGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TTAAAGCTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACATCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- TTCTCCAAGGAGTCTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GCTATTTTAAAGGTGTGTCCAGTGTGT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGAAGCACCTGTGGTTCTT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CCTCCACAGTGAGAGTCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCATC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGCAGCAGCAACAGGTGCCCA -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GCTCAGCTCCTGGGGCT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGAARCCCCAGCDCAGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- CTSTTSCITYTGGATCTCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTSC TGCTGGGYTCC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GAGGCAGTTCAGATTCAA -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CCTGGGCCCAGTCTGTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CTCCTCASYCTCCTCACT -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GGCCTCCTATGWGCTGAC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- GTTCTGTGGTTTTTCTGAGCTG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1 Leader-A 5'- ACAGGGTCTCTCTCCCAG -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- ACAGGTCTCTGTGCTCTGC -3' (imprimación PCRa)	Thermo Fisher Científico	NA
VH1 Leader-A 5'- CCCTCTCSCAGSCTGTG -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- TCTTGGGCCAATTTTATGC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- ATTCYCAGRCTGTGGTGAC -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- CAGTGGTCCAGGCAGGG -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH1 Leader-A 5'- AGGCCACTGTCACAGCT -3' (PCRa primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH1-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAG GTG CAGCTGGTRCAGTCTGGG -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH2-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAG R GCACCTTGARGGAGTCTGGTCC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH3-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAG G TKCAGCTGGTGGAGTCTGGG -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH4-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAG GTGCAGCTGCAGGAGTCGG -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH5-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC GARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAG -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VH6-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACC AGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCC –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
IgG-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCCAGAGGTGCT CYTGGA –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
IgM-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCCAGAGGTGGAA TTCTCACAGGAGACGAGG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
IgD-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCCAGAGGTGTGT CTGCACCCTGATATGATGG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
IgA1-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCCAGAGGTGCT GGTGCTGCAGAGGCTCAG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
IgA2-int 5'- GGGCCGCTGTGCCCCAGAGGTGCTG GTGCTGTCGAGGCTCAG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK1-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGAC GACATCCAGWTGACCCAGTCTC –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK2-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGAC GATATTGTGATGACCCAGWCTCCAC –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK3-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGAC GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCCA –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK4-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGA CGACATCGTGATGACCCAGTCTC –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK5-Int tag 5'- CTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGA	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
CGAAACGACACTCACGCAGTCTC –3’ (PCRb primer)		
VK6-Int tag 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAA ATTGTGCTGACWCAGTCTCCA –3’ (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VK7-Int tag 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG ACGACATTGTGCTGACCCAGTCT –3’ (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
CK-int 5’- GGGAAGATGAAGACAGATGGT –3’ (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL1-Int tag 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG ACCAGTCTGTGYTGACKCAGCC –3’ (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL2-Int tag 5’- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGTCTGCCCTGACTCAGCC –3’ (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
VL3-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGG TGACTCYTATGAGCTGACWCAGCCAC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL3l-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGG TGACTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL4ab-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGCYTGTGCTGACTCAATC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL4c-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACT GGTGACCTGCCTGTGCTGACTCAGC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL5,9-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACT GGTGACCAGSCTGTGCTGACTCAGCC -3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL6-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
ACAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACT –3' (PCRb primer)		
VL7,8-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT GACCAGRCTGTGGTGACYCAGGAG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VL10-Int tag 5'- CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTG ACCAGGCAGGGCWGACTCAG –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
CL-int 5'- GGGYGGGAACAGAGTGACC –3' (PCRb primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
VH_Tag fwd seq 5'- CTGGGTTCCAGGTTCC ACTGGTGAC –3' (Sequencing primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
CK_int 5'- GGGGAAGATGAAGACAGATGGT –3' (Sequencing primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
CL_int 5'- GGGYGGGAACAGAGTGACC –3' (Sequencing primer)	Thermo Fisher Scientific	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
HV13221H_R474 5'- GCTGTGCCCCC AGAGGTG -3' (Sequencing primer)	Thermo Fisher Scientific	NA
SARS-CoV-2 or WIV1-CoV E gene subgenomic RNA primer/probe: forward primer: 5'-CGATCTCTTGTAGATCTGTTCT C-3'; reverse primer: 5'- ATATTGCAGCAGTACGCACACA -3'; Probe: 5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACT GCGCTTCG-BHQ1-3'.	Taqman	NA
SARS-CoV-2 N gene subgenomic RNA primer/probe: forward primer: 5'- CGATCTCTTGTAGA TCTGTTCT C-3'; reverse primer: 5'- GGTGAACC AAGACGCAGTAT-3'; Probe: 5'-FAM- TAACCAG AATGGAGAACGCAGTG GG-BHQ1-3'.	Taqman	NA
WIV1-CoV N gene subgenomic RNA primer/probe: forward primer: 5'- CGATCTCTTGTAGATCTGTTCT C-3'; reverse primer: 5'- TGTGAACCAAGACGCAGT ATTA T-3'; Probe: 5'-FAM-	Taqman	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
TAACCAGAATGGAGG ACGCAATG GG-BHQ1-3';		
SARS-CoV-2 total viral RNA E gene primer/probe: forward primer: 5'- ACAGGTACGTTAATAGTTAATA GCGT-3', reverse primer: 5'-ATATTGCAGCAGTAC GCACACA -3'; probe: 5'- 6FAM/ACACTAGCCATCC TTACTGCGCT TCG/IABkFQ-3'.	Taqman	NA

Recombinant DNA

HV1301409_4A (human IgG1_4A heavy chain backbone)	Genscript	NA
pH510049_VRC_LS.v2 (human IgG1_LS heavy chain backbone)	Genscript	NA
HV1301410 (human kappa chain backbone)	Genscript	NA

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
HV1301414.v2 (human lambda chain backbone)	Genscript	NA
pcDNA3.1-SARS-CoV-2_SgE (for making subgenomic RNA standard RNA)	Genscript	NA
pcDNA3.1-SARS-CoV-2_SgN (for making subgenomic RNA standard RNA)	Genscript	NA
pcDNA3.1-WIV1-CoV_SgN (for making subgenomic RNA standard RNA)	Genscript	NA
Software and algorithms		
Diva	BD Biosciences	https://www.bdbiosciences.com/en-us
FlowJo v9.9.4	FlowJo	https://www.flowjo.com

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
GraphPad Prism v8.3.1	GraphPad Software Inc	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
SAS v9.4	SAS Institute	NA
Cloanalyst Program	(Kepler et al., 2014)	NA
Biacore S200 Evaluation software	Cytiva	NA
Coot	(Emsley et al., 2010)	Version 0.8.9.2
Relion	(Scheres, 2012 , Scheres, 2016)	Version 3.1
Phenix	(Afonine et al., 2018 , Liebschner et al., 2019)	Version 1.17
UCSF Chimera	(Pettersen et al., 2004)	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
ISOLDE	(Croll, 2018)	Version 1.1

Reactivo o recurso	Fuente	Identificador
Chimera X	(Goddard et al., 2018)	https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/x/
PyMol	The PyMOL Molecular Graphics System (Schrö and dinger, 2015).	https://www.pymol.org/2/
Leginon system	(Suloway et al., 2005).	NA
cryoSPARC	(Punjani et al., 2017)	https://cryosparc.com
Bio-Plex Manager Software	Bio-Rad	NA
Adobe Illustrator 2020	Adobe	NA
Adobe Photoshop CC 2019	Adobe	NA
Abrir en una ventana separada		

Disponibilidad de recursos

Contacto con el cliente potencial

Se debe dirigir más información y solicitudes de reactivos y serán cumplidas por el contacto principal Kevin O. Saunders(kevin.saunders@duke.edu).

Disponibilidad de materiales

Los abdominales y otros reactivos generados en este estudio están disponibles a partir del contacto principal con un Acuerdo de Transferencia de Materiales completado.

Disponibilidad de datos y código

Los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles de los autores correspondientes a pedido.

Modelo experimental y detalles del tema

Sujetos humanos

Se recolectaron hisopos nasofaríngeos y muestras de sangre periférica de un donante convaleciente de COVID-19 (MESSI ID #450905) en días designados después del inicio informado de los síntomas de COVID. El PBMC del donante de SARS-CoV fue proporcionado por el NIH/VRC. Los especímenes humanos se recolectaron y utilizaron con el consentimiento informado de los participantes del estudio y de conformidad con la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico de la Universidad de Duke (DUHS IRB Pro00100241).

Recopilación de datos de síntomas

Los síntomas autoinformados de los participantes se registraron en cada punto temporal para 39 categorías de síntomas (secreción nasal, congestión nasal, estornudos, tos, dificultad para respirar, malestar general, malestar en la garganta, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos temblorosos, pérdida del olfato, pérdida del gusto, sudoración excesiva, mareos, dolor detrás de los ojos, picazón / lagrimeo, visión borrosa, problemas de audición, dolor de oído, confusión, rigidez en el cuello, glándulas inflamadas, palpitaciones, dolor en el pecho, dolor en las articulaciones, dolor muscular, fatiga, pérdida de apetito, dolor abdominal, náuseas / vómitos, diarrea, hinchazón, picazón en la piel, erupción cutánea, lesiones cutáneas, sangrado inusual, dedos rojos de los pies o dedos de los pies, ojos rojos, otro: especificar). Cada síntoma se puntuó en una escala de 0 a 4, con 0 indicando no presente, 1 leve, 2 moderado, 3 graves y 4 síntomas muy graves. El recuento diario de síntomas (número de categorías de síntomas distintos de cero) y la gravedad de los síntomas (suma de todas las puntuaciones de síntomas) se determinaron para cada punto de tiempo de la encuesta. En el momento de la inscripción, se determinó la fecha de inicio de los síntomas, y una encuesta inicial de síntomas "históricos" registró la puntuación máxima para cada categoría de síntomas entre el inicio de los síntomas y la inscripción en el estudio.

Non-human primate model

In total, 62 outbred adult male and female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), 2-4 kg body weight, were randomly allocated to groups. The study protocol and all veterinarian procedures were approved by the Bioqual IACUC per a memorandum of understanding with the Duke IACUC, and were performed based

on standard operating procedures. Macaques were housed and maintained in an Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care-accredited institution in accordance with the principles of the National Institute of Health. All studies were carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health in BIOQUAL (Rockville, MD). BIOQUAL is fully accredited by AAALAC and through OLAW, Assurance Number A-3086. All physical procedures associated with this work were done under anesthesia to minimize pain and distress in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research." Teklad 5038 Primate Diet was provided once daily by animal size and weight. The diet was supplemented with fresh fruit and vegetables. Fresh water was given *ad libitum*. All monkeys were maintained in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Mouse models

Eleven to twelve-month old female immunocompetent BALB/c mice purchased from Envigo (BALB/c AnNHsd, stock# 047) were used for SARS-CoV-2 *in vivo* protection experiments as described previously ([Dinnon et al., 2020](#); [Leist et al., 2020a](#)). Ten-week-old *HFH4-hACE2* transgenic mice were bred and maintained at the University of North Carolina at Chapel Hill and used for WIV-1 *in vivo* protection experiments. Mice were housed in groups of five animals per cage and fed standard chow diet. The study was carried out in accordance with the recommendations for care and use of animals by the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), National Institutes of Health and the Institutional Animal Care. All mouse studies were performed at the University of North Carolina (Animal Welfare Assurance #A3410-01) using protocols (19-168) approved by the UNC Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) and all mouse studies were performed in a BSL3 facility at UNC.

Method details

Expression of recombinant viral proteins

The SARS-CoV-2 ectodomain constructs were produced and purified as described previously ([Wrapp et al., 2020b](#)). Plasmids encoding Spike-2P and HexaPro ([Hsieh et al., 2020](#)) were transiently transfected in FreeStyle 293F cells (Thermo Fisher) using Turbo293 (SpeedBiosystems). The cultures were collected on Day 6 post transfection. The cells were separated from the medium by centrifugation. Protein were purified from filtered cell supernatants by StrepTactin resin (IBA) and additionally by size exclusive chromatography using Superose 6 10/300 increase column (GE Healthcare) in 2mM Tris pH 8, 200mM NaCl, 0.02% NaN₃. SARS-CoV-2 NTD was produced as previously described ([Zhou et al., 2020b](#)). SARS-CoV RBD and MERS-CoV Spike RBD were cloned into pVRC8400 vector for mammalian expression (FreeStyle 293F or Expi293F suspension cells). The construct contains an HRV 3C-cleavable C-terminal SBP-8xHis tag. Supernatants were harvested 5 days post-transfection and passaged directly over Cobalt-TALON resin (Takara) followed by size exclusion chromatography on Superdex 200 Increase (GE Healthcare) in 1x PBS. Typical yields from FreeStyle 293F cells are approximately 50 mg/liter

culture. Affinity tags can be removed using HRV 3C protease (ThermoScientific) and the protein repurified using Cobalt-TALON resin to remove the protease, tag and non-cleaved protein.

Antigen-specific single B cell sorting

Plasmablasts were sorted by flow cytometry from the SARS-CoV-2 donor on Day 11 and Day 15 post symptom onset. PBMCs were stained with optimal concentrations of the following fluorochrome-Ab conjugates: IgD PE (Clone# IA6-2, BD Biosciences, Catalog# 555779), CD3 PE-Cy5 (Clone# HIT3a, BD Biosciences, Catalog# 555341), CD10 PE-CF594 (Clone# HI10A, BD Biosciences, Catalog# 562396), CD27 PE-Cy7 (Clone# O323, eBioscience, Catalog# 25-0279), CD38 APC-Alexa Fluor (AF) 700 (Clone# LS198-4-2, Beckman Coulter, Catalog# [B23489](#)), CD19 APC-Cy7 (Clone# LJ25C1, BD Biosciences, Catalog# 561743), CD16 BV570 (Clone# 3G8, Biolegend, Catalog# 302035), CD14 BV605 (Clone# M5E2, Biolegend, Catalog# 301834), and CD20 BV650 (Clone# 2H7, BD, Catalog# 563780). The cells were then labeled with Fixable Aqua Live/Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Catalog# [L34957](#)). On a BD FACSAria II flow cytometer (BD Biosciences), plasmablasts were identified as viable CD14/CD16/CD19/CD20^{low}/IgD/CD27^{high}/CD38^{high} cells and sorted as single cells into 96-well plates containing lysis buffer. Sorted plates were frozen at -80°C in the DHVI Flow Facility under BSL3 precautions in the Duke Regional Biocontainment Laboratory (Durham, NC) until processing.

Antigen-specific memory B cells (MBCs) were isolated by flow cytometric sorting from the SARS-CoV-2 donor on Day 36 post symptom onset, and a donor with SARS-CoV history. PBMCs were stained with IgD FITC (Clone# IA6-2, BD Biosciences, Catalog# 555778), IgM PerCp-Cy5.5 (Clone# G20-127, BD Biosciences, Catalog# 561285), CD10 PE-CF594 (Clone# HI10A, BD Biosciences, Catalog# 562396), CD3 PE-Cy5 (Clone# HIT3a, BD Biosciences, Catalog# 555341), CD235a PE-Cy5 (Clone# GA-R2, BD Biosciences, Catalog# 559944), CD27 PE-Cy7 (Clone# O323, eBioscience, Catalog# 25-0279), CD38 APC-AF700 (Clone# LS198-4-2, Beckman Coulter, Catalog# [B23489](#)), CD19 APC-Cy7 (Clone# LJ25C1, BD Biosciences, Catalog# 561743), CD14 BV605 (Clone# M5E2, Biolegend, Catalog# 301834), CD16 BV570 (Clone# 3G8, Biolegend, Catalog# 302035), and fluorescent-labeled SARS-CoV-2 Spike probes (AF647-conjugated Spike-2P, PE-conjugated Spike-2P, AF647-conjugated NTD, AF647-conjugated RBD, VioBright 515-conjugated RBD). The cells were then labeled with Fixable Aqua Live/Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Catalog# [L34957](#)). On a BD FACSAria II flow cytometer (BD Biosciences), antigen-specific MBCs were identified as viable CD3/CD14/CD16/CD235a/CD19/IgD/probe cells and were sorted as single cells into 96-well plates containing lysis buffer. Collection plates were immediately frozen in a dry ice/ethanol bath, and stored at -80°C in the DHVI Flow Facility under BSL3 precautions in the Duke Regional Biocontainment Laboratory until processing. Flow cytometric data were analyzed using FlowJo version 10.⁺⁺⁺

PCR Amplification of human Ab genes

Ab genes were amplified by RT-PCR from flow cytometry-sorted single B cells using the methods as described previously ([Liao et al., 2009](#); [Wrammert et al., 2008](#)) with

modification. The PCR-amplified genes were then purified and sequenced with 10 μ M forward and reverse primers. Sequences were analyzed by using the human library in Cloanalyzer for the VDJ arrangements of the immunoglobulin IGHV, IGKV, and IGLV sequences and mutation frequencies ([Kepler et al., 2014](#)). Clonal relatedness of V_HD_HJ_H and V_LJ_L sequences was determined as previously described ([Liao et al., 2013](#)).

Expression of Ab viable region genes as full-length IgG recombinant mAbs

Transient transfection of recombinant Abs was performed as previously described ([Liao et al., 2009](#)). Briefly, purified PCR products were used for overlapping PCR to generate linear human IgG expression cassettes. The expression cassettes were transfected into Expi293F cells using ExpiFectamine (Thermo Fisher Scientific, Catalog# A14525 and A14527). The supernatant samples containing recombinant IgGs were used for IgG quantification and preliminary ELISA binding screening.

The down-selected human Ab genes were then synthesized and cloned (GenScript) into a human IgG1 backbone (HV1301409_4A) with 4A mutations to enhance circulation half-life and Ab-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or a human IgG1 backbone (pH510049_VRC_LS.v2) with a LS mutation to extend Ab half-life ([Saunders, 2019](#)). Recombinant IgG Abs were then produced in HEK293i suspension cells by transfection with ExpiFectamine and purified using Protein A resin. The purified IgG Abs were run in SDS-PAGE for Coomassie blue staining and western blot for quality control and then used for the downstream experiments.

Ab binding ELISA

For ELISA binding assays of coronavirus Spike Abs, the antigen panel included SARS-CoV-2 Spike S1+S2 ectodomain (ECD) (SINO, Catalog # 40589-V08B1), SARS-CoV-2 Spike-2P ([Wrapp et al., 2020b](#)), SARS-CoV-2 Spike S2 ECD (SINO, Catalog # 40590-V08B), SARS-CoV-2 Spike RBD from insect cell sf9 (SINO, Catalog # 40592-V08B), SARS-CoV-2 Spike RBD from mammalian cell 293 (SINO, Catalog # 40592-V08H), SARS-CoV-2 Spike NTD-Biotin, SARS-CoV Spike Protein DeltaTM (BEI, Catalog # NR-722), SARS-CoV WH20 Spike RBD (SINO, Catalog # 40150-V08B2), SARS-CoV WH20 Spike S1 (SINO, Catalog #40150-V08B1), SARS-CoV RBD, MERS-CoV Spike S1+S2 (SINO, Catalog # 40069-V08B), MERS-CoV Spike S1 (SINO, Catalog #40069-V08B1), MERS-CoV Spike S2 (SINO, Catalog #40070-V08B), MERS-CoV Spike RBD (SINO, Catalog #40071-V08B1), MERS-CoV Spike RBD. En el cribado PRELIMINAR de ELISA de los sobrenadantes de transfección transitoria, también examinamos los Abs contra la proteína proteasa CL del SARS-CoV (BEI, Catálogo # 30105) y la proteína de membrana (M) del SARS-CoV (BEI, Catálogo # 110705).

Para la unión a ELISA, las placas ELISA de 384 pozos se recubrieron con 2 μ g/ml de antígenos en bicarbonato de sodio de 0,1 M durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS + 0.05% Tween 20 y se bloquearon con diluyente de ensayo bloqueado (PBS que contiene 4% (p/v) de proteína de suero de leche, 15% de suero de cabra normal, 0.5% de Tween-20 y 0.05% de azide de sodio) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregaron muestras de mAb purificadas en diluciones

seriadas de 3 veces en diluyente de ensayo a partir de 100 µg / ml, o sobrenadante de transfección no diluido e incubado durante 1 hora, seguido de lavado con PBS-0.1% Tween 20. HrP-conjugado cabra anti-humana IgG secundaria Ab (SouthernBiotech, catálogo # 2040-05) se diluyó a 1: 10,000 e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Estas placas se lavaron cuatro veces y se desarrollaron con sustrato de tetrametilbencidina (SureBlue Reserve- KPL). La reacción se detuvo con 1 M HCl, y densidad óptica a 450 nm (OD₄₅₀) se determinó.

Mediciones de afinidad

Las mediciones SPR de la unión del SARS-CoV-2 Ab Fab a las proteínas Spike-2P o Spike-HexaPro se realizaron utilizando un instrumento Biacore S200 (Cytiva, anteriormente GE Healthcare, DHVI BIA Core Facility, Durham, NC) en HBS-EP+ 1x running buffer. Las proteínas Spike se capturaron por primera vez en un chip de estreptavidina serie S a un nivel de 300-400 RU para Spike-2P y 350-450 unidades de resonancia (RU) para Spike-HexaPro. Los Ab Fabs se inyectaron a 0,5 a 500 nM sobre las proteínas S capturadas utilizando el modo de inyección cinética de ciclo único a un caudal de 50 µL/min. La fase de asociación se mantuvo con inyecciones de 120 o 240 s de cada Fab a concentraciones crecientes seguidas de una disociación de 600 s después de la inyección final. Después de la disociación, las proteínas S se regeneraron a partir de la superficie de la estreptavidina utilizando un pulso de 30 s de glicina pH1.5. Los resultados se analizaron utilizando el software de evaluación Biacore S200 (Cytiva). Se utilizó una superficie de estreptavidina en blanco junto con la unión tampón en blanco para la sustracción de doble referencia para tener en cuenta la unión a proteínas no específicas y la deriva de la señal. Los análisis posteriores de ajuste de curvas se realizaron utilizando un modelo de Langmuir 1:1 con un Rmax local para los Fabs con la excepción de DH1050.1 Fab que se ajustó utilizando el modelo de ligando heterogéneo con Rmax local. Las curvas de enlace notificadas son representativas de dos conjuntos de datos.

Ensayo de bloqueo de ab por resonancia de plasmón de superficie

La unión de RBD y NTD Abs a la proteína S se midió por resonancia de plasmón de superficie (BIAcore 3000; Cytiva, anteriormente GE Healthcare, DHVI BIA Core Facility, Durham, NC) análisis. La competencia y el bloqueo de la unión de Ab se midieron mediante SPR después de la inmovilización por acoplamiento de amina de Abs monoclonal a chips de sensor CM5 (BIAcore / Cytiva). Los experimentos de competencia Ab se realizaron mezclando proteína S y mAb (incubación de 30 minutos) seguidos de inyección durante 5 minutos a 50 µL / min. En ensayos separados y a partir del análisis de la unión a un ligando de unión al epítipo idéntico, se determinó que la proteína S a 20 µM y Ab a 200 µM se unen a la saturación completa. Los ensayos de bloqueo de Ab se realizaron mediante coinyección de proteína S (20 µM) sobre superficies inmovilizadas mAb durante 3 minutos a 30 µL/min y una prueba Ab (200 µM) durante 3 minutos a 30 µL/min. La disociación del complejo sándwich Ab con la proteína espiga se monitoreó durante 10 minutos con flujo tampón y luego una inyección de 24 s de glicina pH2.0 para la regeneración. Se utilizó el enlace de búfer en blanco para la resta para tener en cuenta la deriva de la señal. Los análisis de datos se realizaron con el software BIA-evaluation 4.1 (BIAcore/Cytiva).

Ensayo de bloqueo ace2

Para los ensayos de bloqueo de ACE-2, las placas se recubrieron como se indicó anteriormente con 2 µg / ml de proteína ACE-2 recombinante, luego se lavaron y bloquearon con BSA al 3% en 1X PBS. Mientras que las placas de ensayo se bloquearon, los Abs purificados se diluyeron como se indicó anteriormente, solo en 1% de BSA con 0.05% de Tween-20. En una placa de dilución separada, la proteína Spike-2P se mezcló con el Abs a una concentración final igual a la CE₅₀ en el que la espiga se une a la proteína ACE-2. La mezcla se detuvo incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lavaron las placas de ensayo bloqueadas y se agregó la mezcla de espiga de Ab a las placas de ensayo durante un período de 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se añadió un suero policlonal de conejo contra la misma proteína Spike-2P durante 1 hora, se lavó y se detectó con cabra anti conejo-HRP (Abcam cat# ab97080) seguido de sustrato TMB. La medida en que los Abs fueron capaces de bloquear la unión de la proteína espiga a ACE-2 se determinó comparando la densidad óptica (OD) a 450 nm de Ab más espiga con la OD de los pozos que contienen proteína espiga sin Ab. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de bloqueo: $\text{bloqueo\%} = (100 - (\text{OD Ab} + \text{pico} / \text{OD de pico solamente}) \cdot 100)$.

Microscopía electrónica de tinción negativa

Los fragmentos fab se prepararon digiriendo la IgG con Lys-C, como se describió anteriormente (Zhou et al., 2015). Para cada complejo Fab-spike, una alícuota de proteína espiga a ~concentración de ~1-5 mg/ml que había sido congelada y almacenada a -80 °C se descongeló en un bloque de aluminio a 37 °C durante 5 minutos; luego se mezclaron 1-4 µl de espiga con suficiente Fab para dar una relación molar de 9: 1 de Fab a espiga y se incubó durante 1 hora a 37 °C. El complejo se entrecruzó diluyendo a una concentración final de espiga de 0,1 mg / ml en tampón a temperatura ambiente que contenía 150 mM de NaCl, 20 mM de HEPES pH 7,4, 5% de glicerol y 7,5 mM de glutaraldehído. Después de 5 minutos de reticulación, el exceso de glutaraldehído se apagó agregando suficiente stock de 1 M Tris pH 7.4 para dar una concentración final de 75 mM Tris y se incubó durante 5 minutos. Para la tinción negativa, las rejillas recubiertas de carbono (EMS, CF300-cu-UL) se descargaron con brillo durante 20 s a 15 mA, después de lo cual se incubó una gota de 5 µl de muestra apagada en la rejilla durante 10-15 s, se secó y luego se tiñó con formiato de uranilo al 2%. Después del secado al aire, se capturaron imágenes de rejillas con un microscopio electrónico Philips EM420 operado a 120 kV, a un aumento de 82,000x e imágenes capturadas con una cámara CCD de 2k x 2k a un tamaño de píxel de 4.02 Å.

Procesamiento de imágenes de manchas negativas

Se utilizó el programa RELION 3.0 para todo el procesamiento de imágenes de manchas negativas. Las imágenes se importaron, se corrigieron CTF con CTFFIND y las partículas se seleccionaron utilizando una plantilla de pico de promedios de clase 2D anteriores de pico solo. Las pilas de partículas extraídas se sometieron a 2-3 rondas de promedio y selección de clase 2D para descartar partículas basura y selecciones de fondo. Las pilas de partículas limpias se sometieron a clasificación

3D utilizando un modelo inicial creado a partir de un modelo de espiga desnuda, PDB: [6vsb](#), filtrado de paso bajo a 30 Å. Las clases que mostraban Fabs claramente definidos se seleccionaron para los refinamientos finales, seguidos por el filtrado automático y el afilado del factor B con los parámetros predeterminados de procesamiento de Relion.

Cryo-EM sample preparation, data collection and processing

To prepare Ab-bound complexes of the SARS-CoV-2 2P spike, the spike at a final concentration of 1–2 mg/mL, in a buffer containing 2 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl and 0.02% NaN₃, was incubated with 5–6 fold molar excess of the Ab Fab fragments for 30–60 min. 0.5% final concentration of glycerol was added to the sample right before freezing. 2.5 µL of protein was deposited on a Quantifoil-1.2/1.3 holey carbon grid that had been glow discharged in a PELCO easiGlow Glow Discharge Cleaning System for 15 s at 15 mA. After a 30 s incubation in > 95% humidity and 22°C, excess protein was blotted away for 2.5 s using a Whatman #1 filter paper before being plunge frozen into liquid ethane using a Leica EM GP2 plunge freezer (Leica Microsystems). Cryo-EM data were collected on a Titan Krios (Thermo Fisher) equipped with a K3 detector (Gatan). Data were acquired using the Legion system ([Suloway et al., 2005](#)). All the datasets were energy filtered through either a 20eV or 30eV slit. The dose was fractionated over 50 raw frames and collected at 50ms framerate. Individual frames were aligned and dose-weighted ([Zheng et al., 2017](#)). CTF estimation, particle picking and all downstream data processing steps were carried out in cryoSPARC ([Punjani et al., 2017](#)). After two rounds of 2D classifications during which junk particles were discarded, heterogeneous refinement was performed using low pass filtered maps of unliganded spike as inputs. The output maps showed densities of the bound Fabs, which were further classified by heterogeneous refinement, followed by non-uniform refinement to obtain the final reconstructions that were used for model fitting.

Cryo-EM structure fitting and analysis

Previously published SARS-CoV-2 ectodomain structures of the all ‘down’ state (PDB: [6VXX](#)) and single RBD ‘up’ state (PDB: [6VYB](#)), and models of 2-RBD-up and 3-RBD-up states derived from these, were used to fit the cryo-EM maps in Chimera ([Pettersen et al., 2004](#)). Models of Fabs were generated in SWIS-MODEL and docked into the cryo-EM reconstructions using Chimera. Mutations were made in Coot ([Emsley and Cowtan, 2004](#)). Coordinates were fit to the maps using ISOLDE ([Croll, 2018](#)) followed by iterative refinement using Phenix ([Afonine et al., 2018](#)) real space refinement and subsequent manual coordinate fitting in Coot as needed. Structure and map analysis were performed using PyMol ([Schrö and dinger, 2015](#)), Chimera ([Pettersen et al., 2004](#)) and ChimeraX ([Goddard et al., 2018](#)).

Live SARS-CoV-2 neutralization assays

The SARS-CoV-2 virus (Isolate USA-WA1/2020, NR-52281) was deposited by the Centers for Disease Control and Prevention and obtained through BEI Resources, NIAID, NIH. SARS-CoV-2 Micro-neutralization (MN) assays were adapted from a previous study ([Berry et al., 2004](#)). In short, sera or purified Abs were diluted two-fold and incubated with 100 TCID₅₀ virus for 1 hour. These dilutions are used as the input

material for a TCID₅₀. Each batch of MN includes a known neutralizing control Ab (Clone D001; SINO, CAT# 40150-D001). Data are reported as the last concentration at which a test sample protects Vero E6 cells.

SARS-CoV-2 Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) were performed in the Duke Regional Biocontainment Laboratory BSL3 (Durham, NC) as previously described with virus-specific modifications ([Berry et al., 2004](#)). Briefly, two-fold dilutions of a test sample (e.g., serum, plasma, purified Ab) were incubated with 50 PFU SARS-CoV-2 virus (Isolate USA-WA1/2020, NR-52281) for 1 hour. The Ab/virus mixture is used to inoculate Vero E6 cells in a standard plaque assay ([Coleman and Frieman, 2015](#); [Kint et al., 2015](#)). Brevemente, los cultivos infectados se incuban a 37 ° C, 5% de CO₂ durante 1 hora. Al final de la incubación, se agrega 1 ml de una superposición viscosa (1: 1 2X DMEM y 1.2% de metilcelulosa) a cada pozo. Las placas se incuban durante 4 días. Después de la fijación, tinción y lavado, se secan las placas y se cuentan las placas de cada dilución de cada muestra. Los datos se informan como la concentración a la que se neutraliza el 50% del virus de entrada. Se incluye un control de neutralización conocido Ab en cada ejecución por lotes (Clon D001; SINO, CAT# 40150-D001). Se utilizó GraphPad Prism para determinar IC/EC₅₀ valores.

Se describieron previamente los ensayos de neutralización de virus competentes para la replicación del SARS-CoV-2 nano-luciferasa (nanoLuc), SARS-CoV nanoLuc y WIV1-CoV nanoLuc ([Hou et al., 2020](#); [Menachery et al., 2016](#); [Sheahan et al., 2017](#)).

Ensayo de neutralización del SARS-CoV-2 pseudo-tipado y ensayos que mejoran la infección

La neutralización del virus pseudotipado sars-CoV-2 Spike se realizó mediante la adopción de un ensayo de infección descrito anteriormente ([Korber et al., 2020](#)) con vectores lentivirales e infección en 293T/ACE2. MF (la línea celular fue amablemente proporcionada por los Dres. Mike Farzan y Huihui Mu en Scripps). Las células se mantuvieron en DMEM que contenían 10% de FBS y 50 µg/ml de gentamicina. Un plásmido de expresión que codifica el pico de longitud completa optimizado para codones de la cepa Wuhan-1 (VRC7480), fue proporcionado por los doctores Barney Graham y Kizzmekia Corbett en el Centro de Investigación de Vacunas, Institutos Nacionales de Salud (EE. La mutación D614G se introdujo en VRC7480 mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning de Agilent Technologies (Catálogo # 210518). La mutación fue confirmada por secuenciación completa del gen spike. Los pseudoviriones se produjeron en células HEK293T/17 (ATCC cat. no. CRL-11268) por transfección utilizando Eugene 6 (Promega, Catalog #E2692). Los pseudoviriones para la infección por 293T/ACE2 se produjeron por coinfección con una columna vertebral lentiviral (pCMV ΔR8.2) y el gen reportero de luciferasa luciérnago (pHR' CMV Luc) ([Naldini et al., 1996](#)). Los sobrenadantes de cultivo de transfecciones se clarificaron de las células mediante centrifugación y filtración a baja velocidad (filtro de 0,45 µm) y se almacenaron en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

Para los ensayos de neutralización 293T/ACE2, se incubó una dosis pretitulada de virus con 8 diluciones seriadas de 3 o 5 veces de mAbs por duplicado en un volumen total de 150 µl durante 1 hora a 37 °C en placas de cultivo recubiertas de poli-L-

lisina de fondo plano de 96 pozos (Corning Biocoat). Las células se suspendieron utilizando la solución enzimática de expresión trypLE (Thermo Fisher Scientific) y se añadieron inmediatamente a todos los pozos (10.000 células en 100 μ L de medio de crecimiento por pozo). Un conjunto de 8 pozos de control recibió células + virus (control de virus) y otro conjunto de 8 pozos recibió células solo (control de fondo). Después de 66-72 horas de incubación, se eliminó el medio por aspiración suave y se agregaron 30 μ L de tampón de lisis Promega 1x a todos los pozos. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 100 μ L de reactivo de luciferasa Bright-Glo a todos los pozos. Después de 1-2 minutos, 110 μ L del lisato celular se transfirieron a una placa blanca / negra (Perkin-Elmer). La luminiscencia se midió utilizando un luminómetro PerkinElmer Life Sciences, Modelo Victor2. Los títulos de neutralización son la concentración de mAb (CI_{50}/IC_{80}) en el que las unidades de luminiscencia relativa (RLU) se redujeron en un 50% y un 80% en comparación con los pozos de control del virus después de la sustracción de las RLU de fondo. Los valores de neutralización negativos son indicativos de mejora de la infección. El porcentaje máximo de inhibición (MPI) es la reducción de RLU a la concentración más alta de mAb probada.

Para los ensayos de neutralización de TZM-bl, se incubó una dosis pretitulada de virus con diluciones seriadas de 3 veces de la muestra de prueba por duplicado en un volumen total de 150 μ L durante 1 hora a 37 ° C en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos. Se agregaron células recién tripsinizadas (10,000 células en 100 μ L de medio de crecimiento que contenía 75 μ g / ml de dextrano DEAE) a cada pozo. Un conjunto de pozos de control recibió células + virus (control de virus) y otro conjunto recibió células solo (control de fondo). Después de 68-72 horas de incubación, se retiraron 150 μ L de medio cultivado de cada pozo, y se agregaron 100 μ L de Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System (PerkinElmer Life Sciences) y se incubaron placas durante 2 min a temperatura ambiente. Después de este período, 150 μ L del lisato se transfirieron a placas sólidas negras (Costar) para mediciones de luminiscencia en un instrumento Perkin Elmer. Los títulos de neutralización son la dilución sérica en la que las unidades de luminiscencia relativas (RLU) se redujeron en un 50% y un 80% en comparación con los pozos de control del virus después de la sustracción de las RLU de fondo. MPI es la reducción de RLU a la concentración más alta de mAb probada. Los ensayos de mejora de la infección se realizaron con el mismo formato pero utilizando líneas celulares TZM-bl que expresan de manera estable cada uno de los cuatro receptores Fc γ R humanos (Pérez et al., 2009). En este ensayo, un aumento de las RLU sobre la señal de control del virus representa la entrada mediada por FcR.

Estudio de protección de primates no humanos

Grupos de cinco macacos cynomolgus (2-4 kg) recibieron infusión intravenosa con Abs a 10 mg/kg de peso corporal en el día -3, en relación con el desafío del virus infeccioso. Por cada animal, 10^5 PFU ($\sim 10^6$ TCID₅₀) El virus SARS-CoV-2 (Isolate USA-WA1/2020) se diluyó en 4 ml, y se administró por 1 ml por vía intranasal y 3 ml intratraquealmente el día 0. Las muestras de plasma y suero se recogieron los días -5, 0, 2 y 4. Se recolectaron hisopos nasales, lavados nasales y lavado broncoalveolar (BAL) los días -5, 2 y 4.

Histopatología e Inmunohistoquímica (IHC)

Las muestras pulmonares de primates no humanos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se procesaron y se bloquearon en parafina para su análisis histológico. Todas las muestras se seccionaron a 5 µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para histopatología de rutina. Las secciones se examinaron bajo microscopía de luz utilizando un microscopio Olympus BX51 y las fotografías se tomaron con una cámara Olympus DP73.

La tinción para el antígeno del SARS-CoV-2 se logró en el sistema automatizado Bond RX con el sistema de detección de definición de polímeros (Leica) utilizado según el protocolo del fabricante. Las secciones de tejido se desparasaron con Bond Dewaxing Solution (Leica) a 72 ° C durante 30 min y luego se rehidrataron con lavados con alcohol graduado y 1x Immuno Wash (StatLab). La recuperación de epítomos inducida por calor (HIER) se realizó utilizando Epitope Retrieval Solution 1 (Leica), calentada a 100°C durante 20 minutos. Se aplicó un bloqueo de peróxido (Leica) durante 5 min para calmar la actividad endógena de la peroxidasa antes de aplicar el SARS-CoV-2 Ab (1:2000, GeneTex, GTX135357). Los abdominales se diluyeron en diluyente abdominal reductor (Agilent). Posteriormente, el tejido se incubó con un polímero HRP anti-conejo (Leica) y se coloreó con cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) durante 10 min. Las diapositivas fueron contrateñidas con hematoxilina. Para la tinción de macrófagos, se utilizaron Abs para los siguientes marcadores: CD3 (marcador de células T; Bio Rad, Catálogo # MCA1477; Dilución 1:600), Iba1 (marcador de macrófagos; Wako, Catálogo # 019-19741; Dilución 1:800), CD68 (marcador de macrófagos M1, Sigma-Millipore, Catálogo # HPA048982; dilución 1:1000), CD163 (marcador de macrófagos M2; Abcam, Catálogo # ab182422; Dilución 1:500), HLA-DP/DQ/DR (Catálogo # Marcador de macrófagos M1; Dako, Catálogo # M0775; Dilución 1:100), CD11b (marcador de monocitos/granulocitos; Abcam, Catálogo # ab52478; Dilución 1:1000).

Las muestras fueron evaluadas por un patólogo veterinario certificado por la junta de manera cegada. Se evaluaron y calificaron las secciones del pulmón caudal izquierdo (Lc), medio derecho (Rm) y caudal derecho (Rc) para la presencia de inflamación por tinción de H&E, y para la presencia de nucleocápside de SARS-CoV-2 por tinción de IHC. Las sumas de las puntuaciones Lc, Rm y Rc en cada animal se muestran en las figuras.

Ensayo Luminex

Para el perfil de citoquinas, se midieron muestras de BAL de macacos cynomolgus concentrados 7 veces utilizando una matriz de perlas multiplex de 25 analitos (Millipore, catálogo # PRCYT2MAG40K) que incluye sCD137, Eotaxin, sFasL, FGF-2, Fractalkine, Granzyme A, Granzyme B, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-16, IL-17A, IL-17E / IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL-28A, IL-31, IL-33, IP-10, MIP-3α, Perforin, RANTES, TNFβ. Las muestras se prepararon de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante y se leyeron utilizando un lector de matriz de suspensión Flexmap 3D (Luminex Corp.). Los datos se analizaron utilizando el software de gestión Bio-Plex v6.2 (Bio-Rad).

Para la cuantificación de Ab humanos, la proteína SARS-CoV-2 Spike-2P, la proteína A/Solomon Islands/3/2006 de hemaglutinina (HA) o la albúmina sérica bovina (Sigma) fue carbodiimida acoplada a perlas MagPlex-C (Luminex Corp) de acuerdo con el protocolo del fabricante de perlas. Brevemente, las cuentas se lavaron en H₂O luego se activa por incubación con 5 mg/ml de sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida y 5 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) clorhidrato de carbodiimida (ThermoFisher) durante 20 minutos. Las perlas activadas se lavaron dos veces en PBS (ThermoFisher) y luego se vórtice a 1.500 RPM durante dos horas a temperatura ambiente con 25 µg de proteína por $5,0 \times 10^6$ perlas. Las perlas etiquetadas se lavaron en PBS (ThermoFisher), 1% BSA, 0.02% Tween-20, 0.05% Azide de sodio (todo Sigma), se contaron con un hemaciómetro y se almacenaron a -80 ° C. Los sueros de NHP se diluyeron 1:200 en tampón de ensayo (PBS, 1% BSA, pH 7.4, GIBCO), luego se agregaron 50 µL de suero diluido o Ab monoclonal 3 veces diluido en serie en tampón de ensayo (1000-0.45ng / mL) a una placa de 96 pozos y se mezclaron con 50 µL de tampón de ensayo que contenía 2500 BSA conjugadas cuentas (control negativo) más 2500 HA o cuentas conjugadas con espigas. La placa se sacudió a 800 RPM durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces en tampón de ensayo y luego se agregaron 100 µL 4 µg / ml de clon de IgG Fc antihumano conjugado con biotina de ratón H2 (Southern Biotech) en tampón de ensayo a cada pozo. La placa se sacudió a 800 RPM durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces en tampón de ensayo y luego se agregaron 50 µL 4 µg / ml de estreptavidina-r-ficoeretrina (Invitrogen) en tampón de ensayo a cada pozo. La placa se agitaba a 800 RPM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaba dos veces en tampón de ensayo. Las perlas se resuspendieron en tampón de ensayo de 150 µL/pozo, se agitaron a 800 RPM durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se analizaron en un lector de cuentas BioPlex 200 (Bio-Rad). Las concentraciones de Ab específicas del antígeno suero se calcularon utilizando el software Bio-Plex Manager (Bio-Rad) extrapolando los resultados del Ab monoclonal diluido en serie. Los sueros con Abs por encima del límite superior de cuantificación se volvieron a ensayar a 1:1000 o 1:5000. El límite de detección (LOD) para este ensayo es de 0,278 µg/ml.

Estudio de protección del ratón

Los ratones BALB/c inmunocompetentes hembra de once a doce meses de edad comprados a Envigo (BALB/c AnNHsd, stock # 047) se utilizaron para experimentos de protección *in vivo* del SARS-CoV-2 como se describió anteriormente ([Dinnon et al., 2020](#)). Los ratones transgénicos *HFH4-hACE2* de diez semanas de edad fueron criados y mantenidos en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill y utilizados para experimentos de protección *in vivo* WIV-1. Los ratones fueron alojados en grupos de cinco animales por jaula y alimentados con la dieta estándar de chow. Las inoculaciones del virus se realizaron bajo anestesia (ketamina y xilazina) y se hizo un esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales. Para evaluar la eficacia profiláctica de mAbs, los ratones fueron tratados intraperitonealmente con 300 µg de cada mAb o 150 µg de cada mAb en combinación 12 horas antes de la infección. Los ratones se infectaron intranasalmente con 10⁵ PFU del SARS-CoV-2 2AA MA adaptado al ratón ([Dinnon et al., 2020](#)) o WIV-1. Para evaluar la eficacia terapéutica de los mAbs, los ratones fueron tratados intraperitonealmente con 300 µg de cada mAb o 150 µg de cada mAb en

combinación 12 horas después de la infección. Cuarenta y ocho horas después de la infección, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron cosechados para el título viral medido por ensayos de placa y análisis de ARN. En otro estudio, los ratones BALB/c hembra de cincuenta y dos semanas de edad fueron i.p. inyectados con DH1052 (200 µg/ratones, n = 10) o CH65 control Ab (200 µg/ratones, n = 9). Después de 12 horas, los ratones fueron desafiados con 10⁴ PFU del virus SARS-CoV-2 MA10 adaptado al ratón ([Leist et al., 2020a](#)). Los ratones fueron sacrificados en el día 4 después de la infección, y los pulmones fueron cosechados para el título viral medido por ensayos de placa y análisis de ARN. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de los animales por parte de la Oficina de Bienestar animal de laboratorio (OLAW), los Institutos Nacionales de Salud y el Cuidado Institucional de Animales. Todos los estudios con ratones se realizaron en la Universidad de Carolina del Norte (Animal Welfare Assurance #A3410-01) utilizando protocolos (19-168) aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la UNC (IACUC) y todos los estudios con ratones se realizaron en una instalación BSL3 en UNC.

Extracción y cuantificación de ARN viral

El ensayo para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) del SARS-CoV-2 detecta el ARN total utilizando el conjunto de cebadores/sondas de la OMS E_Sarbeco (Charité/Berlin). Se utilizó una plataforma automatizada de preparación de muestras QIAasympyphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemania) junto con un kit midi DSP de virus/patógeno y el protocolo *complex800* para extraer ARN viral de 800 µL de muestras agrupadas. Un cebador inverso específico para el gen de la envoltura del SARS-CoV-2 (5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3') fue recocido al ARN extraído y luego transcrito inversamente en aDNc usando SuperScript™ III Transcriptasa Inversa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) junto con RNase Out (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El aDNc resultante se trató con RNasa H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y luego se agregó a una mezcla maestra de expresión génica personalizada 4x TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) que contenía cebadores y una sonda de hidrólisis con etiqueta fluorescente específica para el gen de la envoltura del SARS-CoV-2 (imprimación delantera 5'-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3', imprimación inversa 5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3', sonda 5'-6FAM/AC ACT AGC C/ZEN TCC TTA CTG CGC TTC G/IABkFQ-3'). La qPCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) utilizando los siguientes parámetros del termociclador: calor a 50 ° C, mantener durante 2 min, calentar a 95 ° C, mantener durante 10 min, luego se repiten los siguientes parámetros durante 50 ciclos: calor a 95 ° C, mantener durante 15 s, enfriar a 60°C y mantener durante 1 minuto. Las copias de ARN del SARS-CoV-2 por reacción se interpolaron utilizando datos del ciclo de cuantificación y una dilución en serie de un plásmido de ADN personalizado altamente caracterizado que contiene la secuencia del gen de la envoltura del SARS-CoV-2. Las copias medias de ARN por mililitro se calcularon aplicando el factor de dilución del ensayo (DF = 11,7). El límite de detección (LOD) para este ensayo es de aproximadamente 62 copias de ARN por mililitro de muestra.

Ensayo de ARNm subgenómico

El gen E del SARS-CoV-2 y el ARNm subgenómico (ARNm) del gen N se midieron mediante una RT-qPCR de un solo paso adaptada de los métodos descritos anteriormente ([Wölfel et al., 2020](#); [Yu et al., 2020](#)). Para generar curvas estándar, una secuencia de sgRNA del gen E del SARS-CoV-2, incluida la secuencia líder 5'UTR, la secuencia reguladora transcripcional (TRS) y los primeros 228 pb del gen E, se clonó en un plásmido pcDNA3.1. Para generar el gen N sgRNA del SARS-CoV-2, el gen E fue reemplazado por los primeros 227 pb del gen N. Los plásmidos pcDNA3.1 respectivamente fueron linealizados, transcritos utilizando MEGAscript T7 Transcription Kit (ThermoFisher, Catalog # AM1334) y purificados con MEGAclean Transcription Clean-Up Kit (ThermoFisher, Catalog # AM1908). Los productos de ARN purificado se cuantificaron en Nanodrop, se diluyeron en serie y se citaron como estándares E sgRNA o N sgRNA.

El ARN extraído de muestras de animales o estándares se midió en ensayos de expresión génica personalizados de Taqman (ThermoFisher Scientific). Para estos ensayos utilizamos TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher, catálogo # 4444432) y cebadores/sondas personalizados dirigidos al gen E sgRNA (cebador delantero: 5' CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCCE 3'; cebador inverso: 5' ATATTGCAGCAGT ACGCACACA 3'; sonda: 5' FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3') o el gen N sgRNA (cebador delantero: 5' CGATCTCTGTAGATCTGTTCTCTC 3'; cebador inverso: 5' GGTGAA CCAAGACGCAGTAT 3'; sonda: 5' FAM-TAACCAGAAATGGAGAACGCAGTG GG-BHQ1 3'). Las reacciones RT-qPCR se llevaron a cabo en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 3 (Applied Biosystems) o un sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa: transcripción inversa a 50 ° C durante 5 minutos, desnaturalización inicial a 95 ° C durante 20 s, luego 40 ciclos de desnaturalización-recocido-extensión a 95 ° C durante 15 s y 60 ° C durante 30 s. Se utilizaron curvas estándar para calcular E o N sgRNA en copias por ml; el límite de detecciones (LOD) para los ensayos de E y N sgRNA fue de 12,5 copias por reacción o 150 copias por ml de BAL/líquido hisopo nasal.

Cuantificación y análisis estadístico

Los datos se trazaron utilizando Prism GraphPad 8.0. Se realizó una prueba de suma de rango exacta de Wilcoxon con un nivel alfa de 0,05 para comparar las diferencias entre los grupos que utilizaron SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC). No se realizaron ajustes en los valores de p para comparaciones múltiples.

[Vete a:](#)

Reconocimientos

Agradecemos a los donantes de COVID-19 inscritos en el Protocolo de Estudio Molecular y Epidemiológico de Sospecha de Infección (MESSI), al equipo de apoyo clínico de MESSI, al Núcleo de la Unidad de Acceso Clínico del Instituto de Vacunas Humanas de Duke (DHVI) y al Núcleo de Evaluación de Calidad de Inmunología y Virología de DHVI por la adquisición, el procesamiento y la biobanca de muestras. Agradecemos a J. Gilmore, S. Slater, K. Hwang, A.Y. Abuahmad, T. Evangelous, C. Jones, K. Anasti, M. Berry, S. Venkatayogi, P. Rawls,

L. Smith, J. Hwang, B. Bryan, J. Li, H. Chen, N. De Naeyer, la Instalación de Citometría de Flujo DHVI y la instalación Duke BMI CORE por la asistencia técnica. Agradecemos a los Dres.M. Gagne y D.C. Douek de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) por ser asistentes con ensayos de ARN subgenómico. Agradecemos a K. Soderberg, E. Donahue, A. Karlsson, A. Newman y W. Edwards por la gestión del programa. El procesamiento de muestras de donantes COVID-19, la clasificación citométrica de flujo y los ensayos de neutralización de virus competentes para la replicación se realizaron en el Laboratorio Regional de Biocontención de Duke, que recibió apoyo parcial para la construcción del NIH, NIAID (UC6-AI058607). Este trabajo fue apoyado por NIH, NIAID, DAIDS subvención AI142596 (B.F.H.), el Estado de Carolina del Norte financiado por la Ley de Ayuda, Alivio y Seguridad Económica del Coronavirus (Ley CARES) (B.F.H.), la Fundación Ting Tsung & Wei Fong Chao (B.F.H.), suplemento de NIH a R01 AI145687 (P.A.), subvenciones de NIH R01AI157155 y U54CA260543 (R.S.B.), NIH F32 AI152296 (D.R.M), subvención anterior NIH NIAID T32 AI007151 (D.R.M), Burroughs Wellcome Fund Postdoctoral Enrichment Program (D.R.M.), NIH NIAID U19AI142596 grant (B.F.H.), NIH R01 AI146779 y una subvención MassCPR (A.G.S.), becas de capacitación: NIGMS T32 GM007753 (B.M.H. y T.M.C.), T32 AI007245 (J.F.), y un acuerdo de cooperación con DOD/DARPA (HR0011-17-2-0069; G.D.S). Los datos de Cryo-EM se recopilaron en el Centro Nacional de Acceso y Capacitación de Cryo-EM y el Centro de Microscopía Electrónica Simons ubicado en el Centro de Biología Estructural de Nueva York, con el apoyo del programa De Crio-EM de Alta Resolución Transformadora del Fondo Común de los NIH (U24 GM129539) y por subvenciones de la Fundación Simons (SF349247) y el Estado de Nueva York. Agradecemos a E. Eng, C. Hernández y D. Bobe por su ayuda con los experimentos de crio-EM. Agradecemos a M. DeLong, C. Kneifel, M. Newton, V. Orlikowski, T. Milledge y D. Lane de la Oficina de Tecnología de la Información y Computación de Investigación de Duke, y Duke Research Computing(<https://rc.duke.edu/>; NIH 1S10OD018164-01). Agradecemos a L. Pessaint, A. Cook, A. Dodson, K. Steingrebe y B. Bart en BIOQUAL por su ayuda con los estudios de macacos. Los macacos fueron obtenidos por BIOQUAL del Centro de Investigación de Primates del Caribe (Subvenciones P40 OD012217 y 2U42OD021458 de ORIP/OD/NIH).

Contribuciones de los autores

D.L., D.R.M., A.S., X.L., S.M.A., K.C., L.V.T., T.D.S., R.P., V.G., M.D., M.B., T.V.H., T.H.O., E.L., A.F., F.C., G.E.H., A.S., K.T., C.J., L.G.P., C.M., A.M., E.S., D.W.C., K.W.B., M.M., B.M.N. y L.L.S. realizaron experimentos y analizaron datos. R.J.E., K. Mansouri, K. Manne, S.G., K.J., M.K., V.S. y P.A. realizaron experimentos y análisis de estructuras. W.R. y Y.W. proporcionaron análisis estadísticos. K.W., C.T.D., T.N.D., G.D.S., D.C.M., C.W.W., E.P., M.A.M., I.N.M., R.S., H.A., M.G.L. y R.S.B. supervisaron los estudios. A.G.S., J.F., B.M.H., T.M.C., I-T.T., T.Z., P.D.K., J.M. y B.G. proporcionaron reactivos clave. K.O.S. y B.F.H. concibieron, diseñaron y supervisaron el estudio y evaluaron todos los datos. D.L., R.J.E., P.A., K.O.S. y B.F.H. escribieron el artículo. Todos los autores revisaron y aprobaron el manuscrito.

Declaración de intereses

B.F.H., G.D.S., K.O.S., R.P., D.L., P.A. y X.L. han solicitado patentes relativas al SARS-CoV-2 Abs que están relacionadas con este trabajo. Todos los demás autores declaran no tener conflicto de intereses.

[Vete a:](#)

Notas

Publicado: junio 18, 2021

[Vete a:](#)

Notas

La información complementaria se puede encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.021>.

[Vete a:](#)

Información complementaria

Datos S1. Información de Cryo-EM, relacionada con la Figura 4:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(6.4M, pdf)

Cuadro S1. Pantalla de unión ELISA de alto rendimiento de Abs recuperados de donantes de SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1, relacionados con la Figura 1:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(124K, xlsx)

Cuadro S2. Análisis inmunogenético de abs seleccionados neutralizantes y no neutralizantes del SARS-CoV-2, relacionado con la Figura 2:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(65K, xlsx)

Cuadro S3. Afinidad de RBD y NTD Fabs por las proteínas Spike, relacionadas con la Figura 2:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(9.6K, xlsx)

Cuadro S4. Afinidad RBD y NTD Ab por CD16/FcγR3, CD16-2/FcγR4, CD32B/FcγR2b y CD64/FcγR1 de ratón, relacionada con las Figuras 5 y 6:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(9.8K, xlsx)

Cuadro S5. Perfil de citoquinas Luminex de muestras de BAL de macacos cynomolgus:

El conjunto de datos relacionados con la Figura 5 y 7, la Figura S6 y la Figura S7 se mostraron en diferentes pestañas. Las muestras de BAL recogidas en el Día -5 (pre-desafío), Día 2 y Día 4 post-desafío se concentraron (x10) y se midieron utilizando una matriz de cuentas multiplex de 25 analitos mediante el ensayo Luminex. El animal (BB536A) en el grupo DH1052 que exhibió una enfermedad sustancialmente más grave y la expresión de citoquinas se marcó en rojo.

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(54K, xlsx)

[Go to:](#)

References

1. Afonine P.V., Poon B.K., Read R.J., Sobolev O.V., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A., Adams P.D. Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2018;74:531–544. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Arvin A.M., Fink K., Schmid M.A., Cathcart A., Spreafico R., Havenar-Daughton C., Lanzavecchia A., Corti D., Virgin H.W. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;584:353–363. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. 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., COVE Study Group. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021;384:403–416. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q., Michailidis E., Hoffmann H.H., Zhang Y., Dorgham K., Philippot Q., Rosain J., Béziat V., HGID Lab. NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group. COVID Clinicians. COVID-STORM Clinicians. Imagine COVID Group. French COVID Cohort Study Group. Milieu Intérieur Consortium. CoV-Contact Cohort. Amsterdam UMC Covid-19 Biobank. COVID Human Genetic Effort Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370:eabd4585. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Baum A., Ajithdoss D., Copin R., Zhou A., Lanza K., Negron N., Ni M., Wei Y., Mohammadi K., Musser B. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science*. 2020;370:1110–1115. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Baum A., Fulton B.O., Wloga E., Copin R., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Lanza K., Negron N., Ni M. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020;369:1014–1018. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Berry J.D., Jones S., Drebot M.A., Andonov A., Sabara M., Yuan X.Y., Weingartl H., Fernando L., Marszal P., Gren J. Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus. *J. Virol. Methods*. 2004;120:87–96. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Bournazos S., Gupta A., Ravetch J.V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20:633–643. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., Torres J.L., Okba N.M.A., Claireaux M., Kerster G. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*. 2020;369:643–650. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Cao Y., Su B., Guo X., Sun W., Deng Y., Bao L., Zhu Q., Zhang X., Zheng Y., Geng C. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified

- by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell*. 2020;182:73–84. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y. A potent neutralizing human antibody reveals the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 as a site of vulnerability. *Science*. 2020;369:650–655. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 12. Coleman C.M., Frieman M.B. Growth and Quantification of MERS-CoV Infection. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2015;37:15E.2.1–15E.2.19. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 13. Croll T.I. ISOLDE: a physically realistic environment for model building into low-resolution electron-density maps. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2018;74:519–530. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 14. Dekkers G., Bentlage A.E.H., Stegmann T.C., Howie H.L., Lissenberg-Thunnissen S., Zimring J., Rispens T., Vidarsson G. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs*. 2017;9:767–773. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 15. Dinnon K.H., 3rd, Leist S.R., Schäfer A., Edwards C.E., Martinez D.R., Montgomery S.A., West A., Yount B.L., Jr., Hou Y.J., Adams L.E. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature*. 2020;586:560–566. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 16. Edwards R.J., Mansouri K., Stalls V., Manne K., Watts B., Parks R., Janowska K., Gobeil S.M.C., Kopp M., Li D. Cold sensitivity of the SARS-CoV-2 spike ectodomain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021;28:128–131. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 17. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004;60:2126–2132. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 18. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010;66:486–501. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 19. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., Astudillo M.G., Yang D., Miller T.E., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Clayton K.L., Nitido A.D. COVID-19 neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *medRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.10.15.20213512. Published October 20, 2020. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 20. Goddard T.D., Huang C.C., Meng E.C., Pettersen E.F., Couch G.S., Morris J.H., Ferrin T.E. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* 2018;27:14–25. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 21. Graham B.S. Rapid COVID-19 vaccine development. *Science*. 2020;368:945–946. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 22. Grant R.A., Morales-Nebreda L., Markov N.S., Swaminathan S., Querrey M., Guzman E.R., Abbott D.A., Donnelly H.K., Donayre A., Goldberg I.A., NU SCRIPT Study Investigators Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*. 2021;590:635–641. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

23. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science*. 2020;369:1010–1014. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Hassan A.O., Case J.B., Winkler E.S., Thackray L.B., Kafai N.M., Bailey A.L., McCune B.T., Fox J.M., Chen R.E., Alsoussi W.B. A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. *Cell*. 2020;182:744–753. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Hauser B.M., Sangesland M., Lam E.C., Feldman J., Yousif A.S., Caradonna T.M., Balazs A.B., Lingwood D., Schmidt A.G. Engineered receptor binding domain immunogens elicit pan-coronavirus neutralizing antibodies. *bioRxiv*. 2020 2020.2012.2007.415216. [[Google Scholar](#)]
26. Haynes B.F., Corey L., Fernandes P., Gilbert P.B., Hotez P.J., Rao S., Santos M.R., Schuitemaker H., Watson M., Arvin A. Prospects for a safe COVID-19 vaccine. *Sci. Transl. Med.* 2020;12:eabe0948. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Henderson R., Edwards R.J., Mansouri K., Janowska K., Stalls V., Gobeil S.M.C., Kopp M., Li D., Parks R., Hsu A.L. Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020;27:925–933. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Hou Y.J., Okuda K., Edwards C.E., Martinez D.R., Asakura T., Dinno K.H., 3rd, Kato T., Lee R.E., Yount B.L., Mascenik T.M. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*. 2020;182:429–446. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Hsieh C.L., Goldsmith J.A., Schaub J.M., DiVenere A.M., Kuo H.C., Javanmardi K., Le K.C., Wrapp D., Lee A.G., Liu Y. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science*. 2020;369:1501–1505. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Hui K.P.Y., Cheung M.C., Perera R.A.P.M., Ng K.C., Bui C.H.T., Ho J.C.W., Ng M.M.T., Kuok D.I.T., Shih K.C., Tsao S.W. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir. Med.* 2020;8:687–695. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Huo J., Le Bas A., Ruza R.R., Duyvesteyn H.M.E., Mikolajek H., Malinauskas T., Tan T.K., Rijal P., Dumoux M., Ward P.N. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020;27:846–854. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Iwasaki A., Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20:339–341. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Jackson L.A., Anderson E.J., Roupheal N.G., Roberts P.C., Makhene M., Coler R.N., McCullough M.P., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., mRNA-1273 Study Group An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 2020;383:1920–1931. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

34. Jaume M., Yip M.S., Cheung C.Y., Leung H.L., Li P.H., Kien F., Dutry I., Callendret B., Escriou N., Altmeyer R. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease-independent FcγR pathway. *J. Virol.* 2011;85:10582–10597. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Jones B.E., Brown-Augsburger P.L., Corbett K.S., Westendorf K., Davies J., Cujec T.P., Wiethoff C.M., Blackbourne J.L., Heinz B.A., Foster D. LY-CoV555, a rapidly isolated potent neutralizing antibody, provides protection in a non-human primate model of SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv.* 2020 doi: 10.1101/2020.09.30.318972. Published online October 1, 2020. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Joyner M.J., Senefeld J.W., Klassen S.A., Mills J.R., Johnson P.W., Theel E.S., Wiggins C.C., Bruno K.A., Klompas A.M., Lesser E.R. Effect of Convalescent Plasma on Mortality among Hospitalized Patients with COVID-19: Initial Three-Month Experience. *medRxiv.* 2020 2020.2008.2012.20169359. [[Google Scholar](#)]
37. Ju B., Zhang Q., Ge J., Wang R., Sun J., Ge X., Yu J., Shan S., Zhou B., Song S. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature.* 2020;584:115–119. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Kam Y.W., Kien F., Roberts A., Cheung Y.C., Lamirande E.W., Vogel L., Chu S.L., Tse J., Guarner J., Zaki S.R. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine.* 2007;25:729–740. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Kepler T.B., Munshaw S., Wiehe K., Zhang R., Yu J.S., Woods C.W., Denny T.N., Tomaras G.D., Alam S.M., Moody M.A. Reconstructing a B-Cell Clonal Lineage. II. Mutation, Selection, and Affinity Maturation. *Front. Immunol.* 2014;5:170. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Kint J., Maier H.J., Jagt E. Quantification of infectious bronchitis coronavirus by titration in vitro and in ovo. *Methods Mol. Biol.* 2015;1282:89–98. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., Sheffield COVID-19 Genomics Group Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell.* 2020;182:812–827. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Lee W.S., Wheatley A.K., Kent S.J., DeKosky B.J. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat. Microbiol.* 2020;5:1185–1191. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Leist S.R., Dinnon K.H., 3rd, Schäfer A., Tse L.V., Okuda K., Hou Y.J., West A., Edwards C.E., Sanders W., Fritch E.J. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. *Cell.* 2020;183:1070–1085. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

44. Leist S.R., Schäfer A., Martinez D.R. Cell and animal models of SARS-CoV-2 pathogenesis and immunity. *Dis. Model. Mech.* 2020;13:dmm046581. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Liao H.X., Levesque M.C., Nagel A., Dixon A., Zhang R., Walter E., Parks R., Whitesides J., Marshall D.J., Hwang K.K. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods.* 2009;158:171–179. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Liao H.X., Lynch R., Zhou T., Gao F., Alam S.M., Boyd S.D., Fire A.Z., Roskin K.M., Schramm C.A., Zhang Z., NISC Comparative Sequencing Program Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature.* 2013;496:469–476. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Liebschner D., Afonine P.V., Baker M.L., Bunkóczi G., Chen V.B., Croll T.I., Hintze B., Hung L.W., Jain S., McCoy A.J. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2019;75:861–877. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.* 2020;584:450–456. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Liu Y., Soh W.T., Tada A., Arakawa A., Matsuoka S., Nakayama E.E., Li S., Ono C., Torii S., Kishida K. An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein is targeted by COVID-19 patient antibodies. *bioRxiv.* 2020 2020.2012.2018.423358. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Menachery V.D., Yount B.L., Jr., Sims A.C., Debbink K., Agnihothram S.S., Gralinski L.E., Graham R.L., Scobey T., Plante J.A., Royal S.R. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113:3048–3053. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Nagashima H., Tezuka T., Tsuchida W., Maeda H., Kohroki J., Masuho Y. Tandemly repeated Fc domain augments binding avidities of antibodies for Fcγ receptors, resulting in enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 2008;45:2752–2763. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Nagashima H., Ootsubo M., Fukazawa M., Motoi S., Konakahara S., Masuho Y. Enhanced antibody-dependent cellular phagocytosis by chimeric monoclonal antibodies with tandemly repeated Fc domains. *J. Biosci. Bioeng.* 2011;111:391–396. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Naldini L., Blömer U., Gage F.H., Trono D., Verma I.M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:11382–11388. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
54. Pak J.E., Sharon C., Satkunarajah M., Auperin T.C., Cameron C.M., Kelvin D.J., Seetharaman J., Cochrane A., Plummer F.A., Berry J.D., Rini J.M. Structural insights into immune recognition of the severe acute respiratory

- syndrome coronavirus S protein receptor binding domain. *J. Mol. Biol.* 2009;388:815–823. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Perez L.G., Costa M.R., Todd C.A., Haynes B.F., Montefiori D.C. Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. *J. Virol.* 2009;83:7397–7410. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 56. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004;25:1605–1612. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 57. Pinto D., Park Y.J., Beltramello M., Walls A.C., Tortorici M.A., Bianchi S., Jaconi S., Culap K., Zatta F., De Marco A. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature.* 2020;583:290–295. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 58. 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., C4591001 Clinical Trial Group Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020;383:2603–2615. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 59. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods.* 2017;14:290–296. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 60. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.* 2020;584:437–442. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 61. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., de Meulder D., van Amerongen G., van den Brand J., Okba N.M.A. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020;368:1012–1015. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 62. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020;369:956–963. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 63. Saunders K.O. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Front. Immunol.* 2019;10:1296. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 64. Schäfer A., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Leist S.R., Cipolla M., Bournazos S., Schmidt F., Maison R.M., Gazumyan A., Martinez D.R. Antibody potency, effector function, and combinations in protection and therapy for SARS-CoV-2 infection in vivo. *J. Exp. Med.* 2021;218:e20201993. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 65. Scheres S.H. A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *J. Mol. Biol.* 2012;415:406–418. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

66. Scheres S.H.W. Processing of Structurally Heterogeneous Cryo-EM Data in RELION. *Methods Enzymol.* 2016;579:125–157. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
67. Schrödinger L. 2015. The PyMOL Molecular Graphics System. [[Google Scholar](#)]
68. Sempowski G.D., Saunders K.O., Acharya P., Wiehe K.J., Haynes B.F. Pandemic Preparedness: Developing Vaccines and Therapeutic Antibodies For COVID-19. *Cell.* 2020;181:1458–1463. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
69. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., Leist S.R., Pyrc K., Feng J.Y., Trantcheva I. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* 2017;9:eal3653. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
70. Shi R., Shan C., Duan X., Chen Z., Liu P., Song J., Song T., Bi X., Han C., Wu L. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;584:120–124. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
71. Suloway C., Pulokas J., Fellmann D., Cheng A., Guerra F., Quispe J., Staggs S., Potter C.S., Carragher B. Automated molecular microscopy: the new Legation system. *J. Struct. Biol.* 2005;151:41–60. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
72. Takada A., Ebihara H., Feldmann H., Geisbert T.W., Kawaoka Y. Epitopes required for antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2007;196(Suppl 2):S347–S356. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
73. Ubol S., Halstead S.B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010;17:1829–1835. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
74. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veersler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181:281–292. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
75. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J. Virol.* 2020;94:e02015. 19. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
76. Wang S.F., Tseng S.P., Yen C.H., Yang J.Y., Tsao C.H., Shen C.W., Chen K.H., Liu F.T., Liu W.T., Chen Y.M., Huang J.C. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;451:208–214. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
77. Wang Q., Zhang L., Kuwahara K., Li L., Liu Z., Li T., Zhu H., Liu J., Xu Y., Xie J. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect. Dis.* 2016;2:361–376. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
78. Wang Q., Chen Y., Pelletier M., Cvitkovic R., Bonnell J., Chang C.Y., Koksai A.C., O'Connor E., Gao X., Yu X.Q. Enhancement of antibody functions through Fc multiplications. *MAbs.* 2017;9:393–403. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

79. Wec A.Z., Wrapp D., Herbert A.S., Maurer D.P., Haslwanter D., Sakharkar M., Jangra R.K., Dieterle M.E., Lilov A., Huang D. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies. *Science*. 2020;369:731–736. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
80. Whittle J.R., Zhang R., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Dormitzer P.R., Haynes B.F., Walter E.B., Moody M.A. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:14216–14221. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
81. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581:465–469. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
82. Wrammert J., Smith K., Miller J., Langley W.A., Kokko K., Larsen C., Zheng N.Y., Mays I., Garman L., Helms C. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008;453:667–671. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
83. Wrapp D., De Vlieger D., Corbett K.S., Torres G.M., Wang N., Van Breedam W., Roose K., van Schie L., Hoffmann M., Pöhlmann S., VIB-CMB COVID-19 Response Team Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell*. 2020;181:1004–1015. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
84. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367:1260–1263. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
85. Wu Y., Wang F., Shen C., Peng W., Li D., Zhao C., Li Z., Li S., Bi Y., Yang Y. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science*. 2020;368:1274–1278. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
86. Yilla M., Harcourt B.H., Hickman C.J., McGrew M., Tamin A., Goldsmith C.S., Bellini W.J., Anderson L.J. Replicación del sars-coronavirus en monocitos/macrófagos periféricos humanos. *Virus Res*. 2005; 107:93–101. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
87. Yip M.S., Leung N.H., Cheung C.Y., Li P.H., Lee H.H., Daëron M., Peiris J.S., Bruzzone R., Jaume M. Infección dependiente de anticuerpos de macrófagos humanos por coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *Virol. J*. 2014; 11:82. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
88. Yip M.S., Leung H.L., Li P.H., Cheung C.Y., Dutry I., Li D., Daëron M., Bruzzone R., Peiris J.S., Jaume M. Mejora dependiente de anticuerpos de la infección por coronavirus SARS y su papel en la patogénesis del SARS. *Hong Kong Med. J*. 2016; 22(3, Supl 4):25–31. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

89. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., McMahan K., Mahrokhian S.H., Nkolola J.P., Liu J., Li Z., Chandrashekar A. Dna vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Ciencia*. 2020; 369:806–811. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
90. Zhang Q., Bastard P., Liu Z., Le Pen J., Moncada-Velez M., Chen J., Ogishi M., Sabli I.K.D., Hodeib S., Korol C., COVID-STORM Clinicians. Médicos COVID. Imagina el Grupo COVID. Grupo de Estudio de Cohorte COVID francés. Cohorte CoV-Contact. Biobanco UMC Covid-19 de Ámsterdam. Esfuerzo genético humano COVID. NIAID-USUHS/TAGC GRUPO DE INMUNIDAD COVID Errores congénitos de inmunidad IFN tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. *Ciencia*. 2020; 370:eabd4570. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
91. Zheng S.Q., Palovcak E., Armache J.P., Verba K.A., Cheng Y., Agard D.A. MotionCor2: corrección anisotrópica del movimiento inducido por haz para mejorar la microscopía crioeónica. *Nat. Métodos*. 2017; 14:331–332. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
92. Zhou J., Chu H., Li C., Wong B.H., Cheng Z.S., Poon V.K., Sun T., Lau C.C., Wong K.K., Chan J.Y. Replicación activa del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio e inducción aberrante de citoquinas inflamatorias y quimiocinas en macrófagos humanos: implicaciones para la patogénesis. *J. Infectar. Dis.* 2014; 209:1331–1342. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
93. Zhou D., Duyvesteyn H.M.E., Chen C.P., Huang C.G., Chen T.H., Shih S.R., Lin Y.C., Cheng C.Y., Cheng S.H., Huang Y.C. Base estructural para la neutralización del SARS-CoV-2 por un anticuerpo de un paciente convaleciente. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020; 27:950–958. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
94. Zhou T., Teng I.T., Olia A.S., Cerutti G., Gorman J., Nazzari A., Shi W., Tsybovsky Y., Wang L., Wang S. El diseño basado en la estructura con purificación basada en etiquetas y la biotilación en proceso permiten el desarrollo simplificado de sondas moleculares de picos del SARS-CoV-2. *Rep. Celular* 2020; 33:108322. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
95. Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtein E., Chen R.E., Nkolola J.P., Schäfer A., Reidy J.X., Trivette A., Nargi R.S. Anticuerpos humanos potentemente neutralizantes y protectores contra el SARS-CoV-2. *Naturaleza*. 2020; 584:443–449. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
96. Zost S.J., Gilchuk P., Chen R.E., Case J.B., Reidy J.X., Trivette A., Nargi R.S., Sutton R.E., Suryadevara N., Chen E.C. Aislamiento rápido y perfilado de un panel diverso de anticuerpos monoclonales humanos dirigidos a la proteína espiga del SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020; 26:1422–1427. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
97. Zhou T., Lynch R.M., Chen L., Acharya P., Wu X., Doria-Rose N.A., Joyce M.G., Lingwood D., Soto C., Bailer R.T. Repertorio estructural de anticuerpos neutralizantes del VIH-1 dirigidos al supersitio CD4 en 14 donantes. *Celda*. 2015; 161:1280–1292. doi:

10.1016/j.cell.2015.05.007. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)]
[[CrossRef](#)] [[GoogleScholar](#)]