

[Cell Rep.](#) 2021 24 de agosto; 36(8): 109604.

Publicado en línea 2021 Ago 10. doi: [10.1016/j.celrep.2021.109604](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109604)

PMCID: PMC8352653

PMID: [34411541](#)

## Respuestas convergentes de anticuerpos a la proteína espiga del SARS-CoV-2 en individuos convalecientes y vacunados

Elaine C. Chen,<sup>1</sup> Pavlo Gilchuk,<sup>2</sup> Seth J. Zost,<sup>2</sup> Naveenchandra Suryadevara,<sup>2</sup> Emma S. Winkler,<sup>3,4</sup> Carly R. Cabel,<sup>5,10</sup> Elad Binshtein,<sup>2</sup> Rita E. Chen,<sup>3,4</sup> Rachel E. Sutton,<sup>2</sup> Jessica Rodríguez,<sup>2</sup> Día de Samuel,<sup>2</sup> Luke Myers,<sup>2</sup> Andrés Trivette,<sup>2</sup> Jazmean K. Williams,<sup>6</sup> Edgar Davidson,<sup>6</sup> Shuaizhi Li,<sup>9</sup> Benjamín J. Doranz,<sup>6</sup> Samuel K. Campos,<sup>9,10</sup> Robert H. Carnahan,<sup>2</sup> Curtis A. Thorne,<sup>5,10</sup> Michael S. Diamante,<sup>3,4,7</sup> y James E. Crowe, Jr.<sup>1,2,8,11,\*</sup>

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

Este artículo se basa en una pre impresión previamente disponible: " [Respuestas convergentes de anticuerpos a la proteína espiga del SARS-CoV-2 en individuos convalecientes y vacunados](#) ".

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 grave (SARS-CoV-2) es el agente causal de COVID-19 y la pandemia mundial en curso. La proteína espiga (S) es el principal antígeno reconocido por la respuesta de anticuerpos protectores contra el SARS-CoV-2 ([Jiang et al., 2020](#); [Krammer, 2020](#)). La proteína S se divide en S1, que incluye el dominio de unión al receptor (RBD) y el dominio N-terminal (NTD), y S2, contiene el péptido de fusión y las repeticiones heptadas HR1 y HR2 y media la fusión entre el virus

y la membrana de la célula huésped ([Bosch et al., 2003; Tortorici y Veesler, 2019](#)). El SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-1 comparten aproximadamente el 80% de la identidad de la secuencia de aminoácidos, y ambos utilizan la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2) como receptor de entrada a través de la unión mediada por el RBD ([Hoffmann et al., 2020; Li et al., 2003; Wan et al., 2020](#)).

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos a la proteína SARS-CoV-2 S han sido un foco para el desarrollo de contramedidas médicas contra COVID-19. Muchos estudios han identificado anticuerpos contra las regiones S1 y S2 en la proteína S, con la mayoría de los anticuerpos neutralizantes dirigidos a la RBD en S1 e inhibiendo la unión a ACE2 ([Liu et al., 2020; Robbiani et al., 2020; Seydoux et al., 2020; Wec et al., 2020; Zost et al., 2020b](#)). Se han desarrollado múltiples mAb específicos de RBD como monoterapias o terapias de cóctel, y tres han recibido autorización de uso de emergencia (EUA) en los Estados Unidos.

En los últimos años, se han identificado clonotipos públicos de células B en los repertorios de anticuerpos humanos formados en respuesta a diversos virus, incluido el Ébola ([Cohen-Dvashi et al., 2020; Davis et al., 2019; Ehrhardt et al., 2019](#)), influenza ([Joyce et al., 2016; Pappas et al., 2014; Zost et al., 2021; Sui et al., 2009; Wheatley et al., 2015](#)), virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) ([Sollif et al., 2018; Williams et al., 2015; Wu et al., 2011; Zhou et al., 2015](#)), hepatitis C ([Bailey et al., 2017; Giang et al., 2012](#)), SARS-CoV-2 ([Dong et al., 2021; Nielsen et al., 2020; Yuan et al., 2020a](#)), virus sincitial respiratorio ([Mukhamedova et al., 2021](#)), y en individuos sanos ([Briney et al., 2019; Soto et al., 2019](#)). Estos estudios revelan una convergencia de la selección de células B que resulta en clones de células B circulantes con genes receptores de antígenos genéticamente similares en múltiples individuos. La selección de clonotipos públicos de células B a menudo tiene una base estructural mediada por el reconocimiento de baja afinidad de antígenos de superficie del virus por receptores de células B naïve no codificados en la línea germinal que están preconfigurados para la unión y la activación celular. Los clonotipos públicos son de gran interés, porque la comprensión de los epítopos virales que comúnmente inducen anticuerpos en humanos tiene implicaciones para predecir las respuestas más comunes a las vacunas en grandes poblaciones.

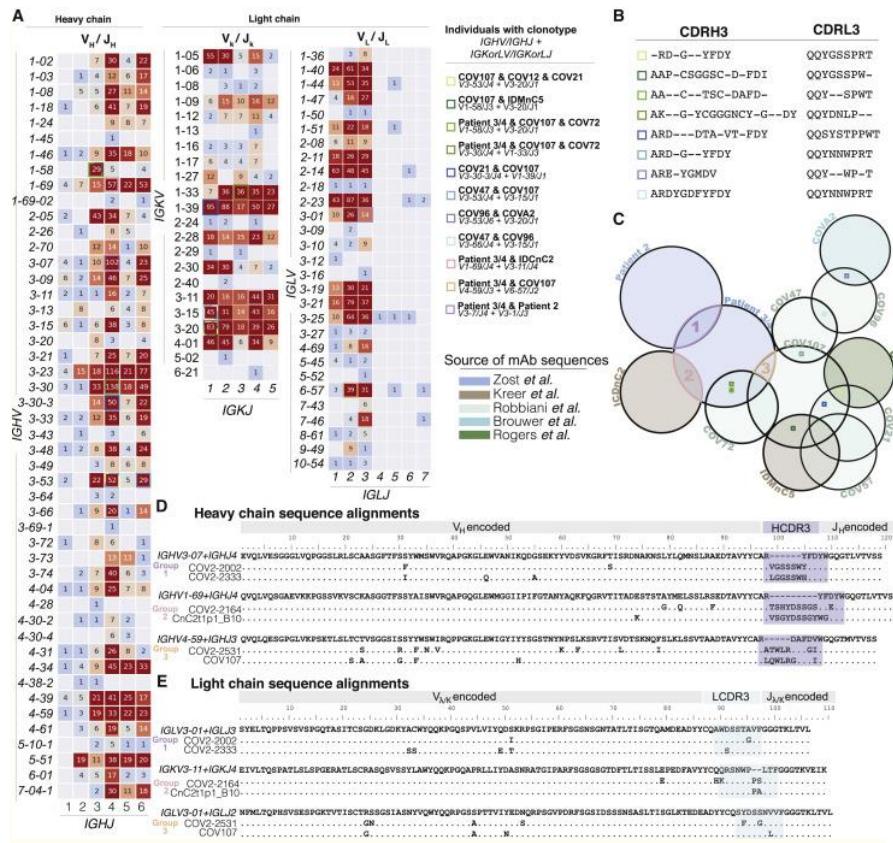
Varios esfuerzos han caracterizado los clonotipos públicos en la respuesta al SARS-CoV-2, y la mayoría de los trabajos se han centrado en neutralizar los clonotipos públicos ([Dong et al., 2021; Robbiani et al., 2020; Tan et al., 2021; Yuan et al., 2020a](#)) que se dirigen a los dominios RBD y NTD de la proteína S1. Sin embargo, es menos claro si los clonotipos públicos se dirigen a otros sitios en el trímero S, como el dominio S2. Los epítopos en el dominio S2 pueden ser de interés, porque estos sitios pueden estar más conservados que los de RBD en diferentes cepas de coronavirus como resultado de restricciones funcionales asociadas con el mecanismo de fusión viral. En este estudio, identificamos 37 clonotipos públicos totales, 27 de los cuales se comparten entre individuos vacunados y convalecientes. Encontramos que los clonotipos compartidos comprenden una proporción sustancial de la respuesta de las células B humanas provocadas al trímero S. También comparamos la respuesta después de la infección o la vacunación con ARNm para investigar la base genética de la eficacia de las vacunas de ARNm en la población. Estos datos muestran que muchos clonotipos se comparten entre individuos convalecientes y vacunados.

[Vete a:](#)

## [Resultados](#)

## Identificación de clonotipos públicos

Primero recolectamos secuencias de genes variables de anticuerpos para mAbs humanos de SARS-CoV-2 de publicaciones existentes que informaron mAbs de individuos con antecedentes de infección por SARS-CoV-2 ([Brouwer et al., 2020](#); [Cao et al., 2020](#); [Kreer et al., 2020](#); [Liu et al., 2020](#); [Robbiani et al., 2020](#); [Rogers et al., 2020](#); [Seydoux et al., 2020](#); [Wee et al., 2020](#); [Zost et al., 2020b](#)). Esta búsqueda identificó un panel de 2.865 secuencias de genes variables de cadena pesada y ligera emparejadas. Agrupamos todas las secuencias agrupando los clones en función del gen de la variable pesada de inmunoglobulina inferida(*IGHV*), el gen de unión pesada de inmunoglobulina(*IGHJ*) y la longitud de aminoácidos de la complementariedad de la cadena pesada que determina la región 3 (CDRH3). Estas secuencias se agruparon de acuerdo con el 70% de identidad de secuencia de nucleótidos en la secuencia de ADN que codifica la CDRH3. A continuación, las secuencias se unieron aún más en función del gen variable de luz de inmunoglobulina inferida(*IGLV* o *IGKV*) y los genes de unión de luz de inmunoglobulina(*IGLJ* o *IGKJ*). Los grupos que cumplían estos criterios de similitud tanto en cadenas pesadas como ligeras con secuencias originarias de dos o más individuos se consideraron clonotipos públicos. Se identificaron once clonotipos públicos en los repertorios de sujetos con infección natural previa ([Figuras 1 A-1C](#)), y estos clones están codificados por una variedad de genes variables de cadena pesada y ligera. De los 11 clonotipos públicos identificados, se ha informado previamente que 5 de los genes de cadena pesada codifican anticuerpos potenteamente neutralizantes del SARS-CoV-2 que se unen a la RBD: *IGHV3-53* ([Yuan et al., 2020a](#)), *IGHV1-58* ([Dong et al., 2021](#)), *IGHV3-30*, *IGHV3-30-3* ([Robbiani et al., 2020](#)), e *IGHV3-66* ([Yuan et al., 2020a](#)). Tres no han sido reportados: *IGHV1-69*, *IGHV4-59e* *IGHV3-7*, *IGHV3-53* e *IGHV3-66* se observan comúnmente en anticuerpos en pacientes con SARS-CoV-2 ([Robbiani et al., 2020](#)) porque los segmentos de genes de la línea germinal codifican motivos de aminoácidos que están preconfigurados para la unión a RBD ([Yuan et al., 2020a](#)). *IGHV1-58* también codifica comúnmente anticuerpos que neutralizan el SARS-CoV-2, porque este segmento de genes de la línea germinal codifica motivos que median la unión a la proteína S ([Dong et al., 2021](#)). En particular, *IGHV1-58* codifica el mAb COV2-2196, que es la base de uno de los dos anticuerpos en un cóctel actualmente en ensayos clínicos de fase III ([Dong et al., 2021; Zost et al., 2020b](#)). También se han encontrado poblaciones de células B expandidas clonalmente que contienen anticuerpos potenteamente neutralizantes codificados por *IGHV3-30* en múltiples individuos ([Robbiani et al., 2020](#)). Sin embargo, el papel de los clonotipos públicos *IGHV1-69*, *IGHV4-59e* *IGHV3-7* en las respuestas al SARS-CoV-2 sigue siendo desconocido. En este artículo, para mayor claridad, designamos clonotipos públicos que incorporan estas tres V adicionales.<sub>H</sub> segmentos de genes como miembros del grupo 1, 2 o 3 mAbs, respectivamente ([Figuras 1C-1E](#)). El grupo 1 es compartido por dos donantes de la cohorte que estudiámos e incluye mAbs COV2-2002 y COV2-2333. El grupo 2 es compartido por un donante de nuestro grupo y un donante previamente descrito IDCnC2 ([Kreer et al., 2020](#)) e incluye anticuerpos COV2-2164 y CnC2t1p1\_B10. Por último, el grupo 3 es compartido por un donante de nuestro grupo y un donante coV107 descrito anteriormente ([Robbiani et al., 2020](#)) e incluye anticuerpos COV2-2531 y C126 ([Figuras 1C-1E](#)). Los aDNc para los genes variables de anticuerpos que codifican cada uno de los seis anticuerpos de los tres grupos de clonotipos públicos se sintetizaron y clonaron en un vector de expresión de IgG1, como se describió anteriormente ([Gilchuk et al., 2020](#)).



## Abrir en una ventana separada

Figura 1

Características de secuencia de los anticuerpos monoclonales contra el SARS-CoV-2

(A) Las secuencias disponibles de mAbs para SARS-CoV-2 de múltiples publicaciones se obtuvieron de bases de datos públicas. Los números dentro de cada caja representan el número de secuencias con el uso indicado del gen. Los cuadros de delineación de color representan clonotipos públicos que se comparten entre los individuos enumerados en la clave del lado derecho. El mapa de calor está codificado por colores para que el rojo represente un mayor número de secuencias utilizando los genes correspondientes, y el azul representa un número menor de secuencias utilizando los genes correspondientes.

(B) Se muestran secuencias CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de cada uno de los ocho clonotipos públicos restantes. Los guiones representan aminoácidos que diferían en el clonotipo público. Cada color de caja se correlaciona con los clonotipos públicos en (A) y (C).

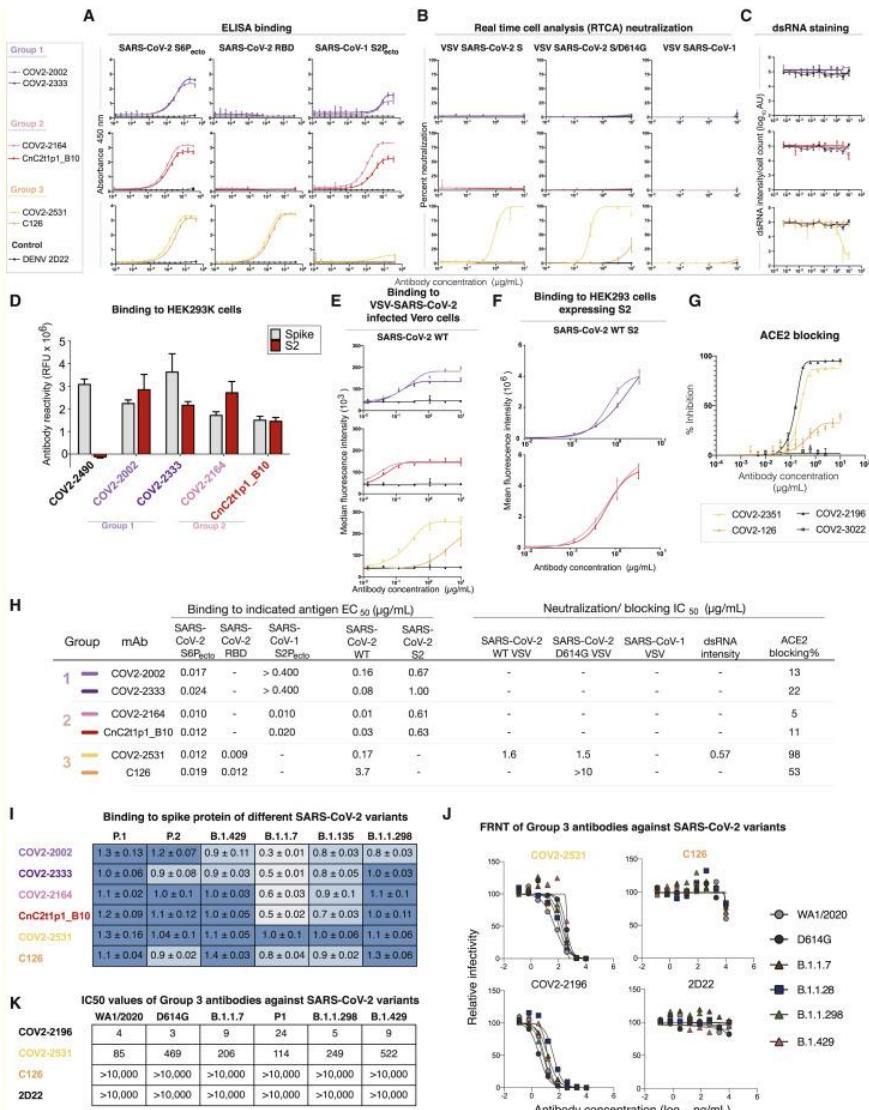
(C) Un diagrama de Venn que ilustra todos los clonotipos públicos identificados entre individuos infectados naturalmente. Los cuadros de colores en las superposiciones del diagrama de Venn representan los clonotipos públicos identificados en (A). Los nuevos clonotipos públicos, designados como grupos 1, 2 o 3, se resaltan en las superposiciones púrpura, rosa o naranja, respectivamente.

(D) Alineaciones de secuencias múltiples de las secuencias de cadena pesada para los grupos 1, 2 o 3 a sus respectivos genes de línea germinal inferidos *IGHV* 3-07/*IGHJ*4, *IGHV*1-69/*IGHJ*4o *IGHV*4-59/*IGHJ*3. La secuencia CDRH3 está resaltada en azul oscuro.

(E) Alineaciones de secuencias múltiples de las secuencias de cadena ligera para los grupos 1, 2 o 3 a sus respectivos genes de línea germinal inferidos *IGLV*3-01/*IGLJ*3, *IGKV*3-11/*IGKJ*4o *IGHV*3-01/*IGLJ*2. La secuencia CDRL3 está resaltada en azul claro.

### Propiedades funcionales de los anticuerpos clonotipos públicos identificados

Para examinar las propiedades de unión de los anticuerpos en estos tres nuevos clonotipos públicos del SARS-CoV-2, probamos seis anticuerpos purificados recombinantes, dos para cada clonotipo público, para la unión al ectodominio de prefusión trimérica estabilizada recombinante de la proteína SARS-CoV-2 S ( $S6P_{ecto}$ ), SARS-CoV-2 RBD, o ectodominio de prefusión trimérica estabilizada recombinante de la proteína SARS-CoV-1 S ( $S2P_{ecto}$ ) proteínas por ELISA ([Figura S1](#)). Los dos anticuerpos del grupo 1, COV2-2002 y COV2-2333, no se unen al SARS-CoV-2 RBD, sino que ambos se unen al SARS-CoV-2  $S6P_{ecto}$  y SARS-CoV-1  $S2P_{ecto}$  proteínas. Sin embargo, no se saturaron en la unión al SARS-CoV-1  $S2P_{ecto}$  a la concentración máxima ensayada (400 ng/ml), lo que indica una unión relativamente débil al SARS-CoV-1  $S2P_{ecto}$ . Los anticuerpos del grupo 2, que incluyen COV2-2164 y ChC2t1p1\_B10, no se unen al SARS-CoV-2 RBD, pero ambos se unen al SARS-CoV-2  $S6P_{ecto}$  y SARS-CoV-1  $S2P_{ecto}$  proteínas. Anticuerpos del grupo 3, que incluyen COV2-2531 y C126, unidos al SARS-CoV-2  $S6P_{ecto}$  y proteínas RBD del SARS-CoV-2 ([Figuras 2 A y 2H](#)). Los anticuerpos del grupo 3 no se unen al SARS-CoV-1  $S2P_{ecto}$ .



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 2

Reactividad y actividad funcional de los anticuerpos de los grupos 1, 2 y 3

Los anticuerpos del grupo 1 se muestran en púrpura claro u oscuro, los anticuerpos del grupo 2 están en rojo o rosa, y los anticuerpos del grupo 3 están en naranja claro u oscuro. mAb DENV 2D22 se utilizó como anticuerpo de control negativo, como se muestra en las líneas en negro. Todos los experimentos se realizan en réplicas biológicas y triplicados técnicos. Se muestra la réplica biológica de un solo experimento representativo.

- A) ELISA vinculante al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>, SARS-CoV-2 RBD o SARS-CoV-1 S2P<sub>ecto</sub> se midió por absorbancia a 450 nm. Se utilizaron concentraciones de anticuerpos a partir de 0,4 µg/ml y se ajustaron 2 veces.
- (B) Actividad de neutralización de anticuerpos contra VSV-SARS-CoV-2, VSV-SARS-CoV-2/D614G y VSV-SARS-CoV-1 determinada mediante el ensayo de análisis celular en tiempo real (RTCA). Se reporta el porcentaje de neutralización. Las concentraciones de anticuerpos comenzaron a 10 µg/ml y se ajustaron 3 veces.
- (C) Actividad de neutralización de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 auténtico (USA-WA1/2020) determinada midiendo la intensidad del dsRNA por recuento celular después de que las células epiteliales pulmonares de Calu3 se inocularon con SARS-CoV-2. Las concentraciones de anticuerpos comenzaron a 10 µg/ml y se ajustaron 3 veces.
- (D) Unión de anticuerpos a la región S (gris) o S terminal de la proteína S de longitud completa (rojo) expresada en la superficie de las células HEK293T que fueron fijadas y permeabilizadas. Los anticuerpos se examinaron a 1 µg/ml. La reactividad de anticuerpos se midió mediante citometría de flujo y se determinaron los valores de fluorescencia celular. CoV2-2490, un anticuerpo dirigido por NTD, se utilizó como control.
- (E) La unión a células Vero infectadas por VSV-SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 wild-type [WT]) se midió mediante citometría de flujo, y se determinaron los valores medios de intensidad de fluorescencia para las curvas de unión dosis-respuesta. El anticuerpo se diluyó 3 veces a partir de 10 µg/ml.
- (F) La unión a la proteína S C-terminal de la región S2 expresada en células HEK293T (SARS-CoV-2 WT S2) se midió mediante citometría de flujo, y se determinaron los valores medios de intensidad de fluorescencia para las curvas de unión dosis-respuesta. El anticuerpo se diluyó 3 veces a partir de 10 µg/ml.
- (G) Inhibición de las curvas de unión a ACE2 para COV2-2531 o C126. Las concentraciones de anticuerpos comenzaron a 10 µg/ml y se ajustaron 3 veces para identificar las curvas de bloqueo de ACE2. COV2-2531 se muestra en naranja claro, y C126 se muestra en naranja oscuro.
- H) La concentración máxima de la mitad (CE<sub>50</sub>) y la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI<sub>50</sub>) para cada una de las curvas de ensayo en [Figuras 3A–3E](#). Todos los valores se denotan como µg/mL. El bloqueo de ACE2 se determinó midiendo la cantidad de ACE2 con la unión a la etiqueta FLAG en presencia de cada anticuerpo, medida por la unión de un anticuerpo anti-FLAG. Se muestra el porcentaje de bloqueo, calculado mediante el uso de la unión a ACE2 sin anticuerpos como bloqueo del 0%.
- (I) Unión de cada anticuerpo a varias variantes de proteínas espiga de preocupación. La unión de cada anticuerpo (a 1 µg/ml) a las variantes del pico del SARS-CoV-2 se muestra en relación con la unión del anticuerpo al pico WT, definido como un valor de 1,0. Las cantidades relativas de cada variante expresadas en células se estimaron utilizando la señal para el anticuerpo 1A9, normalizando la unión promedio de 1A9 (a 1 µg/mL) para cada variante a la unión promedio de 1A9 con el constructo WT. Para cada anticuerpo clonotípico público, los valores de unión a cada pico variante se corrigieron para una expresión de pico equivalente a la del pico WT. El azul más oscuro indica menos cambios en la unión de ese anticuerpo a la variante. El color azul más claro indica más cambios para la unión de ese anticuerpo a la variante.
- (J) Curvas de neutralización de anticuerpos del grupo 3 frente a cepas variantes del SARS-CoV-2. Los anticuerpos se analizaron para la inhibición de la infección de los virus indicados en cultivos monocapa de células Vero-TMPRSS2 utilizando una prueba de neutralización de reducción de enfoque.

(K) IC de neutralización de anticuerpos<sup>50</sup> valores para anticuerpos del grupo 3 contra cepas variantes del SARS-CoV-2. Un experimento representativo de dos realizados por duplicado y CI medio<sup>50</sup> se muestran los valores (ng/mL) de dos experimentos independientes.

Planteamos la hipótesis de que los anticuerpos de los grupos 1 y 2 podrían unirse al dominio S2 del trímero S; La infección por SARS-CoV-2 puede provocar anticuerpos que reconocen epítopos de reactividad cruzada en el dominio S2 ([Ladner et al., 2021](#)). Se probaron anticuerpos para la unión contra el dominio S2 del SARS-CoV-2 S expresado en células HEK293T. Este experimento mostró que los anticuerpos de los grupos 1 y 2 se unen a S2 de manera dependiente de la dosis ([Figuras 2D, 2F y 2H](#)), y reveló que los clonotipos públicos se pueden obtener en el dominio S2 del trímero S.

Los anticuerpos de cada grupo se probaron para la actividad neutralizante utilizando un ensayo de análisis celular en tiempo real (RTCA) previamente descrito que mide la impedancia celular ([Gilchuk et al., 2020; Zost et al., 2020b](#)). Utilizamos el virus de la estomatitis vesicular (VSV) recombinante e infeccioso que expresa las proteínas S del SARS-CoV-2 (cepa WA1/2019), SARS-CoV-2/D614G o SARS-CoV-1 (cepa Urbani) ([Figura S1](#)). Además, utilizamos cultivos auténticos del virus SARS-CoV-2 (WA1/2019) y monocapa de células Calu3, y la neutralización se midió mediante tinción de ARN de doble cadena, que se produce en el citoplasma en células infectadas por virus ([Figura S2](#)). Grupo 3 mAb COV2-2531 neutralizó SARS-CoV-2 (VSV-SARS-CoV-2 y VSV-SARS-CoV-2/D614G) ([Figuras 2B, 2C y 2H](#)) y auténtico SARS-CoV-2, pero no SARS-CoV-1. En contraste, otro grupo de 3 mAb, C126, neutralizó parcialmente la variante SARS-CoV-2 / D614G, pero no neutralizó el vsv-SARS-CoV-2, VSV-SARS-CoV-1 de tipo salvaje (WT) o virus auténtico. Los anticuerpos de los grupos 1 y 2 no mostraron capacidad neutralizante para ninguna de las cepas virales analizadas.

Debido a que ambos anticuerpos del grupo 3 exhibieron capacidad neutralizante, consideramos que podrían bloquear la unión del virus a ACE2, un mecanismo principal de inhibición por anticuerpos dirigidos a RBD ([Hansen et al., 2020; Zost et al., 2020a](#)). Probamos si cada anticuerpo podría bloquear la unión de la proteína S trimérica soluble a la proteína ACE2 humana recombinante. Sólo los anticuerpos del grupo 3 bloquearon la unión a ACE2 ([Figura 2H](#)). Similar al patrón que observamos para la neutralización, COV2-2531 bloqueó completamente la unión a ACE2, mientras que C126 bloqueó parcialmente la unión, con menos del 50% de inhibición en el efecto máximo ([Figura 2G](#)). Por lo tanto, es probable que COV2-2531 neutralice la infección por virus al menos en parte al bloquear la unión a ACE2.

Se evaluó la unión de los seis anticuerpos a las variantes P.1 (Gamma), P.2 (Zeta), B.1.429 (Epsilon), B.1.1.7 (Alpha), B.1.135 (Beta) y B.1.1.298 ([Figura S3](#)). La unión a anticuerpos de los grupos 1 y 2 mAbs se vio afectada en gran medida por los residuos de variantes en B.1.1.7 o B.1.135. Sin embargo, el anticuerpo del grupo 3 COV-2531 mantuvo su capacidad para unirse a todas las variantes probadas. C126, la contraparte menos mutada del clonotipo público del grupo 3, mostró una disminución en la unión a P.2, B.1.1.7 y B.1.135 ([Figura 2I](#)).

Debido a que COV2-2531 mantuvo la unión a todas las variantes probadas, probamos si conservaba su capacidad de neutralización. Los anticuerpos del grupo 3 COV2-2531 y C126 se probaron contra aislados clínicos para los virus B.1.1.7 (Alpha), B.1.1.298 y B.1.429 (Epsilon). Los mAbs también se probaron contra un virus químico WA1/2020 que codifica el gen S de B.1.1.28 (Gamma, Wash-B.1.1.28). Estos resultados se compararon con la neutralización de WA1/2020 y un mutante isogénico

que contenía la mutación D614G (WA1/2020 D614G) ([Figura 2J](#)). C126 carecía de actividad inhibitoria contra los auténticos virus SARS-CoV-2. En comparación, COV2-2531 neutralizó el panel de variantes de virus SARS-CoV-2 de manera comparativa con WA1/2020, con IC<sub>50</sub> valores que oscilan entre 85 y 522 ng/ml ([Figura 2K](#)).

#### **Sitios de unión de anticuerpos clonotipos identificados**

Utilizamos microscopía electrónica (EM) de tinción negativa para obtener imágenes de Fab-SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> Complejos. A pesar de que todos los anticuerpos unidos a la proteína S en ELISA como IgG1, solo el anticuerpo del grupo 3 Fabs COV2-2531 y C126 formaron complejos visualizados en rejillas EM, lo que sugiere que algunos anticuerpos pueden requerir un formato IgG para una unión fuerte ([Figura 3 A](#); [Figura S4](#)). Las reconstrucciones 3D de baja resolución para COV2-2531 y C126 mostraron que estos dos anticuerpos se unen al lado de la RBD y reconocen la cara críptica de la RBD que es accesible solo en la posición "abierta" de la RBD en el contexto del trímero S ([Figuras 3B](#) y [3C](#)).

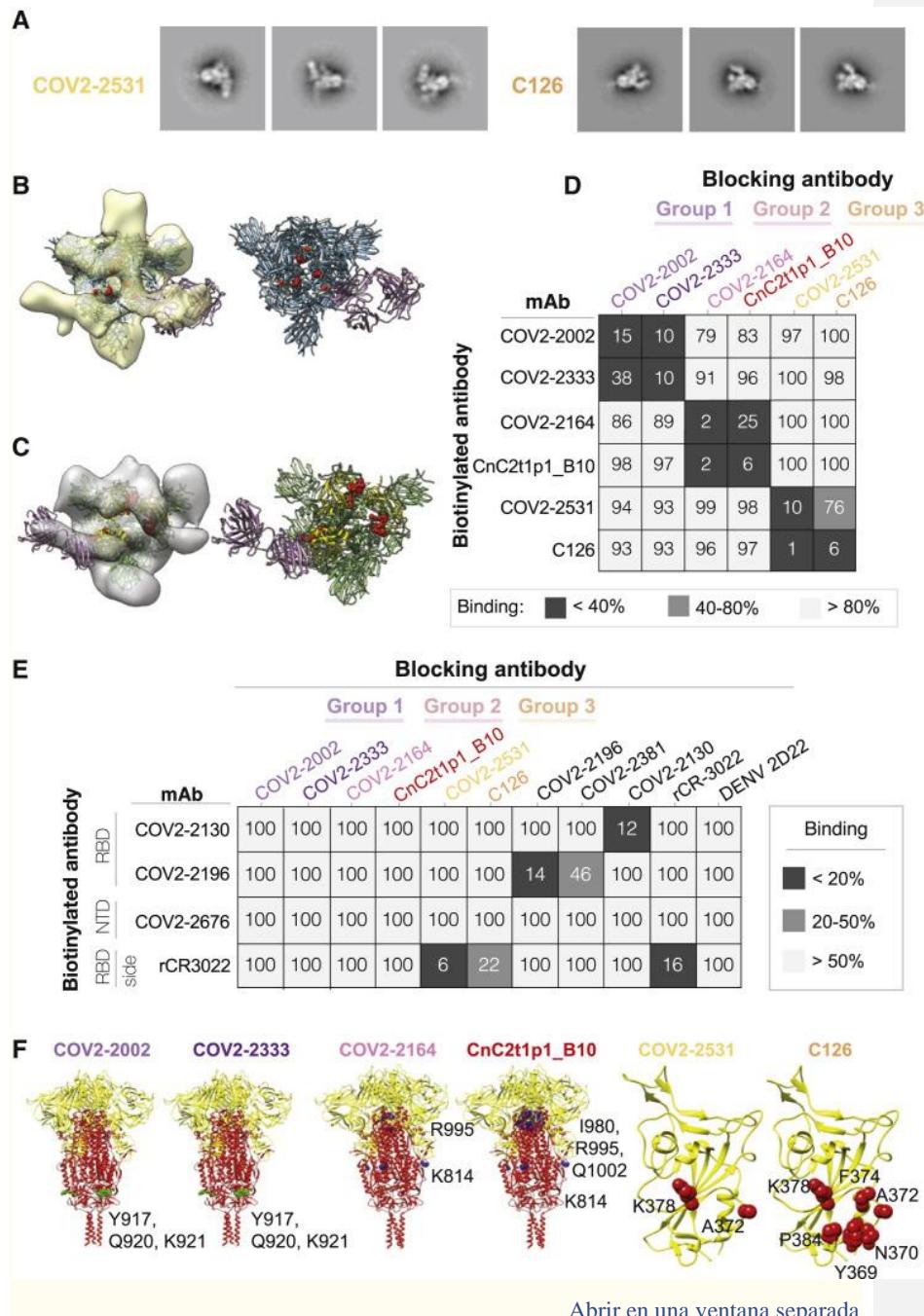


Figura 3

Identificación de epítopos y caracterización estructural de anticuerpos

(A) Tinción negativa EM del SARS-CoV-2 S<sub>6P<sub>ecto</sub></sub> proteína en complejo con formas Fab de diferentes mAbs. Tinción negativa de clases 2D de proteína SARS-CoV-2 S incubada con COV2-2531 o C126. El tamaño de la caja es de 128 pix a 4.36 Å/pix.

(B) volumen 3D mAb COV2-2531 con residuos críticos 372 y 275 mostrados en rojo sobre la proteína S (azul). RBD está en la posición abierta. La densidad corresponde a tres fabs, ya que acoplamos una sola estructura Fab en el mapa de densidad EM, que se muestra en magenta.

(C) Volumen MAB C126 3D con residuos críticos de unión mostrados en rojo. El Fab está acoplado a un protómero de la proteína SARS-CoV-2 S en la conformación abierta. Arriba a la izquierda está el RBD posicionado en conformación abierta, con los otros dos protómeros en el trímero en posición cerrada. La proteína S se muestra en verde, con la RBD en amarillo. El Fab se muestra en magenta.

(D) Resultados de ELISA vinculantes a la competencia para mAbs dentro de cada grupo de clonotipos. Los anticuerpos de bloqueo no etiquetados aplicados al antígeno primero se enumeran en la parte superior, mientras que los anticuerpos biotinilados que se agregan a los pozos recubiertos de antígeno en segundo lugar se indican a la izquierda. El número en cada caja representa el porcentaje de unión no competitiva del anticuerpo biotinilado en presencia del anticuerpo competidor indicado. Los colores del mapa de calor van desde el gris oscuro (unión del <40% del anticuerpo biotinilado) hasta el gris claro (unión del >80% del anticuerpo biotinilado). El experimento se realizó en replicación biológica y triplicado técnico. Se muestra la réplica biológica de un solo experimento representativo.

(E) Datos ELISA de unión a la competencia utilizando anticuerpos de grupo 1, 2 o 3 contra anticuerpos de referencia mapeados por epítopos. Los anticuerpos biotinilados están indicados a la izquierda, y los anticuerpos no etiquetados aplicados primero al antígeno están indicados en la parte superior. Los colores del mapa de calor van desde el gris oscuro (unión del <20% del anticuerpo biotinilado) hasta el gris claro (unión del >50% del anticuerpo biotinilado). El experimento se realizó en réplicas biológicas y triplicados técnicos. Réplica biológica de un solo experimento representativo mostrado.

(F) Resultados de la mutagénesis de exploración con alanina para anticuerpos de los grupos 1, 2 o 3. Se muestran residuos de epítopos S2 (esferas verdes o esferas azules) en la estructura de la proteína S (PDB: [6XR8](#)). S1 es de color amarillo y S2 es rojo. Los epítopos de RBD se muestran en rojo en la estructura de RBD (PDB: [6XR8](#)). Los datos primarios se muestran en [la figura S5](#).

Luego probamos la unión de anticuerpos a células Vero infectadas que fueron inoculadas con virus químéricos VSV-SARS-CoV-2 ([Figura S5](#)). Anticuerpos de cada uno de los grupos unidos a células infectadas dependientes de la dosis, con anticuerpos reactivos RBD del grupo 3 que exhiben una mayor unión que los anticuerpos S2 reactivos del grupo 1 o 2 ([Figuras 2E y 2H](#)). La unión de los anticuerpos del grupo 3 se correlacionó con su capacidad de neutralización, debido a que COV2-2531 mostró una mayor unión que C126. La capacidad de unirse a las células infectadas también sugirió que estos anticuerpos podrían actuar *in vivo* no solo mediante la neutralización directa del virus, sino también a través de funciones mediadas por Fc.

Se utilizó el ELISA de unión a la competencia para la comparación por pares de anticuerpos que se unen al S<sub>6P<sub>ecto</sub></sub> proteína ([Figura 3D](#)). Miembros de cada grupo público de clonotipos agrupados con el otro miembro del mismo grupo por vinculación a la competencia. También competimos con los anticuerpos para unirse contra un grupo más grande de anticuerpos mapeados con epítopos que describimos previamente ([Zost et al., 2020b](#)) que cubren varios sitios en la proteína S y contra rCR3022 ([Yuan et al., 2020b](#)), que se unen menos bien a la RBD del SARS-CoV-2 en comparación con el SARS-CoV-1 y no bloquean la unión a ACE2 ([Figura 2G](#)). Ambos anticuerpos del grupo 3 compitieron con rCR3022, con COV2-2531 exhibiendo un mayor nivel de competencia que C126.

Ninguno de los anticuerpos del grupo 1 o 2 compitió con los anticuerpos de referencia probados ([Figura 3E](#)).

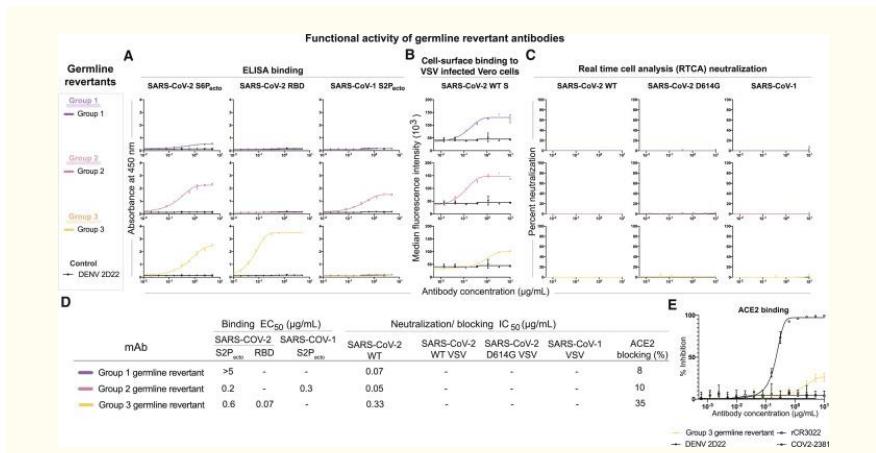
Luego determinamos los residuos de unión críticos a nivel de aminoácidos para cada uno de los anticuerpos clonotípicos públicos mediante la detección de la unión a bibliotecas mutantes de escaneo de alanina de la proteína SARS-CoV-2 S. A372 y K378 fueron residuos críticos para la unión de COV2-2531. Para C126, también identificamos A372 y K378, pero con residuos críticos adicionales Y369, N370, F374 y P384 ([Figura 3F](#); [Figura S6](#)). Los residuos identificados son coherentes con el lugar de unión identificado en los análisis EM de tinción negativa y se solapan con el epítipo de CR3022 ([Yuan et al., 2020b](#)). Era curioso que varios anticuerpos neutralizantes específicos del SARS-CoV-2 compitieran con CR3022, que también se une al SARS-CoV-1 pero no neutraliza. El SARS-CoV-1 tiene un sitio de glicosilación N en N370 en el sitio de unión para estos dos mAbs, del que carece el SARS-CoV-2 ([Yuan et al., 2020b](#)). Esta diferencia en la glicosilación probablemente explica por qué COV2-2531 y C126 no se unen ni neutralizan el SARS-CoV-1, a pesar de que reconocen la cara críptica relativamente conservada de la RBD ([Figura S7](#)). En las bibliotecas de escaneo de alanina, los residuos nativos de alanina se cambian a serina. Es posible que A372 se haya identificado como crítico para la unión por COV2-2531 y C126 porque la mutación A372S resulta en la introducción de la glicosilación ligada a N de N370, en lugar de hacer contacto directo de cadena lateral con los anticuerpos.

El cribado de los anticuerpos del grupo 1 y 2 contra la biblioteca de mutaciones de exploración de alanina del SARS-CoV-2 confirmó que se unieron al dominio S2. Para los anticuerpos del grupo 1 COV2-2002 y COV2-2333, identificamos residuos críticos para ambos anticuerpos (Y917, Q920, K921) en la región de repetición hepática (HR1) de S2. Estos residuos se conservan entre el SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-1. Para los anticuerpos del grupo 2, las pruebas identificaron dos regiones de residuos que eran críticas para la unión. Tanto para COV2-2164 como para CnC2t1p1\_B10, identificamos K814 (también conservado entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1) como crítico para la unión. Además, para ambos anticuerpos, también identificamos R995, y para CnC2t1p1\_B10, I980 y Q1002 ([Figura 3F](#); [Figura S6](#)). K814 no está cerca de I980, R995 o Q1002 en la estructura de la proteína S. Sin embargo, la inspección de las estructuras de proteína S disponibles (PDB: [6XR8](#) y [7C2L](#)) sugirió que los residuos I980, R995 y Q1002 no son fácilmente accesibles a los anticuerpos en la proteína S completa o incluso en ausencia de S1. Estos residuos producen interacciones que probablemente ayudan a mantener la estructura S2, por lo que su mutación podría afectar indirectamente la unión de anticuerpos del grupo 2. Concluimos que K814 es un residuo de epítipo para los anticuerpos del grupo 2 COV2-2164 y CnC2t1p1\_B10. Estos resultados sugieren que los mAbs en cada grupo de clonotípicos públicos tienen residuos de epítipos críticos esencialmente idénticos.

### Propiedades funcionales de las formas revertidas de la línea germinal de anticuerpos de cada clonotípico público identificado

Para determinar si la función de cada grupo de anticuerpos se debía a la reactividad codificada en la línea germinal o al resultado de mutaciones somáticas, investigamos los anticuerpos equivalentes codificados en la línea germinal para cada clonotípico público. Las secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos COV2-2002, COV2-2164 y COV2-2531 se alinearon con las secuencias germinales de [*IGHV3-7/IGHJ4/ + IGLV3-1/IGLJ3*], [*IGHV1-69/IGHJ4 + IGKV3-11/IGKJ4*], o

[IGHV4-59/IGHJ3 + IGLV6-57/IGLJ2], respectivamente. Cada residuo que difería del gen de la línea germinal se revirtió de nuevo al residuo de la línea germinal inferido([Figura S8](#)). Luego probamos si los revertidores de la línea germinal de los anticuerpos en cada grupo compartían propiedades funcionales similares con sus contrapartes mutadas somáticamente. Se probó que cada anticuerpo reversor de la línea germinal se une al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>, SARS-CoV-2 RBD o SARS-CoV-1 S2P<sub>ecto</sub> proteínas. El revertente de la línea germinal del grupo 1 no se alineó al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> o SARS-CoV-1 S2P<sub>ecto</sub>. El revertente de la línea germinal del grupo 2 mantuvo la unión a las proteínas SARS-CoV-2 y SARS-CoV-1, pero exhibió una menor avidez de unión (CE más alta<sub>50</sub> valores) que sus contrapartes maduras COV2-2164 o CnC2t1p1\_B10. El revertente de la línea germinal del grupo 3 se mantuvo unidos al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> y proteínas RBD ([Figuras 4 A y 4D](#)). Cada revertente de la línea germinal también se une a la superficie de las células infectadas por virus ([Figuras 4B y 4D](#)). Aunque ninguno de los revertentes de la línea germinal exhibió capacidad neutralizante ([Figuras 4C y 4D](#)), el revertente de la línea germinal del grupo 3 mostró un bajo nivel de bloqueo de ACE2 ([Figuras 4D y 4E](#)).



[Abrir en una ventana separada](#)

[Figura 4](#)

Reactividad y actividad funcional de los anticuerpos revertidos de la línea germinal

Los anticuerpos revertidos de la línea germinal de los grupos 1, 2 o 3 se muestran en púrpura, rosa o amarillo, respectivamente. DENV 2D22 se utilizó como anticuerpo de control para todos los ensayos, como se muestra en las líneas en negro. Todos los experimentos se realizaron en replicación biológica y triplicado técnico. Se muestra la réplica biológica de un solo experimento representativo, se muestra la media ± SD de triplicados.

(A) Vinculante al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>, SARS-CoV-2 RBD o SARS-CoV-1 S2P<sub>ecto</sub> se midió por absorbancia a 450 nm, como se muestra en las tres primeras columnas.

(B) Unión a células Vero infectadas con VSV-SARS-CoV-2, medida por análisis citométrico de flujo y reportada como intensidad media de fluorescencia.

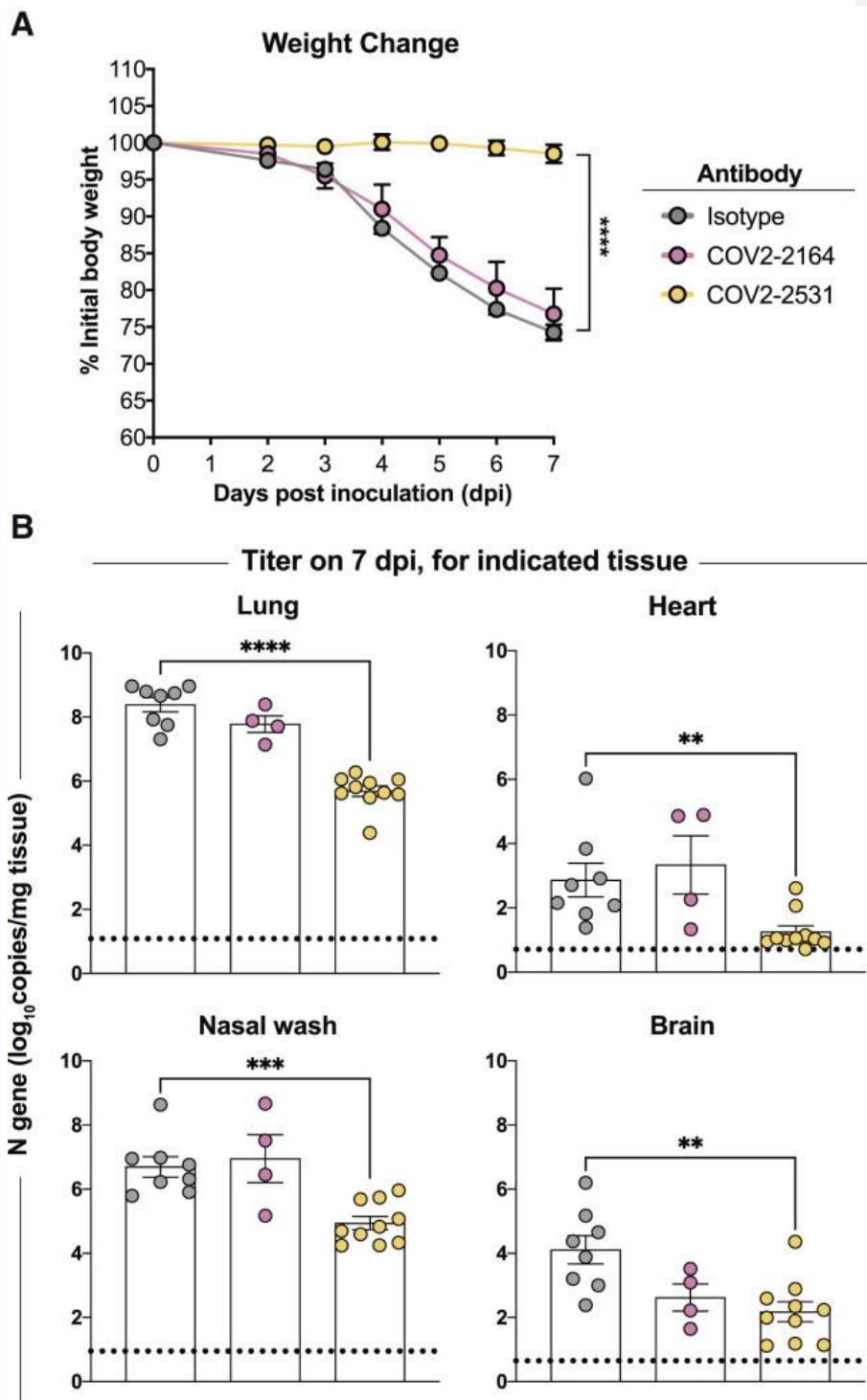
(C) Los resultados de las curvas de neutralización para virus químicos VSV competentes para la replicación en el análisis celular en tiempo real (RTCA) se muestran en las siguientes tres columnas, medidas por el porcentaje de neutralización calculado por el índice celular normalizado.

D) CE vinculantes<sup>50</sup> y EL CI de neutralización<sup>50</sup> valores para cada una de las curvas de ensayo en [Figura 5](#)Un. Todos los valores se denotan como µg/mL. El bloqueo de ACE2 se determinó midiendo la cantidad de ACE2 con unión a la etiqueta FLAG en presencia de cada anticuerpo, medida por la unión de un anticuerpo anti-FLAG. Se muestra el porcentaje de bloqueo, calculado mediante el uso de la unión a ACE2 sin anticuerpos como bloqueo del 0%.

(E) Curvas de unión a la inhibición para el anticuerpo revertente de la línea germinal del grupo 3. La concentración inicial de anticuerpos utilizada fue de 10 µg/ml y se tituló 3 veces en serie para obtener curvas de bloqueo ace2.

### **COV2-2531 confiere protección *in vivo***

Los MAbs pueden actuar mediante inactivación directa del virus, pero la unión de algunos mAbs a la superficie de las células infectadas por el virus ([Figuras 2E y 2H](#)) sugirieron que estos anticuerpos también podrían actuar a través de funciones mediadas por Fc. Por lo tanto, era importante probar algunos clonotipos públicos *in vivo*. Se utilizaron ratones transgénicos K18-hACE2, que desarrollan infección pulmonar grave y enfermedad después de la inoculación intranasal ([Golden et al., 2020](#); [Winkler et al., 2020](#); [Zheng et al., 2021](#)). Los ratones transgénicos K18-hACE2 recibieron un anticuerpo del grupo 2 (COV2-2164), un anticuerpo del grupo 3 (COV2-2531) o un anticuerpo de control de isotipo (DENV 2D22) mediante inyección intraperitoneal (200 µg, 10 mg/kg) 1 día antes de la inoculación intranasal con 10<sup>3</sup> unidades formadoras de placa (PSU) del SARS-CoV-2 (WA1/2020). Los ratones tratados con COV2-2531 fueron protegidos completamente de la pérdida de peso ([Figura 5 A](#)) y mostró una infección viral reducida en el pulmón, el lavado nasal, el corazón y el cerebro ([Figura 5B](#)) en comparación con el grupo tratado con anticuerpos de control de isotipos. Sin embargo, los ratones tratados con COV2-2164 no estaban protegidos de la pérdida de peso, pero mostraron una reducción en la carga viral en el pulmón y el cerebro, pero no en el lavado nasal y el corazón ([Figura 5B](#)). Por lo tanto, los anticuerpos que compiten por unirse con el SARS-CoV-1 mAb rCR3022 pueden obtenerse después de la infección por SARS-CoV-2, algunos de los cuales pueden conferir protección.



[Abrir en una ventana separada](#)

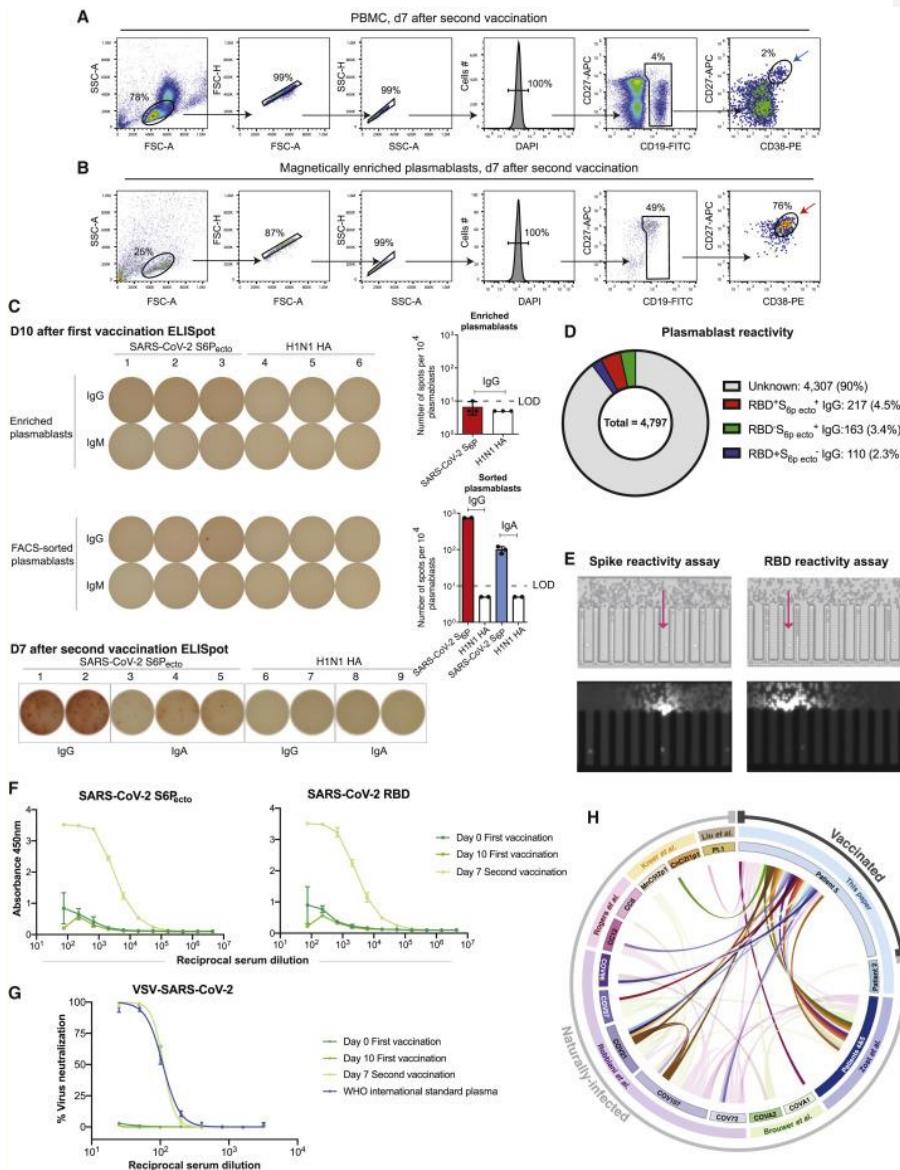
Figura 5

Protección mediada por anticuerpos contra el desafío del SARS-CoV-2 en ratones

(A y B) Los ratones transgénicos machos K18-hACE2 de ocho semanas de edad fueron inoculados por vía intranasal con  $10^3$  PSU del SARS-CoV-2 (cepa WA1/2020). Un día antes de la infección, los ratones recibieron una dosis única de 200 µg de COV2-2351 o COV2-2164 por inyección intraperitoneal. (A) Cambio de peso. El análisis estadístico se realizó solo entre los grupos tratados con isotipo y COV2-2351. Para el isotipo y COV2-2531 (media ± SEM; n = 8–10, dos experimentos: prueba t no apareada del área bajo la curva; \*\*\*p < 0,0001). Para COV2-2164 (media ± SEM; n = 8, dos experimentos). (B) Niveles de ARN viral a los 7 días después de la infección en el pulmón, el lavado nasal, el corazón y el cerebro según lo determinado por qRT-PCR. Para el isotipo y COV2-2531 (media ± SEM; n = 8–10, dos experimentos: ANOVA unidireccional con post-prueba de Tukey: no significativo [ns], \*p < 0,05, \*\*p < 0,001, \*\*\*p < 0,0001, comparación con el grupo de control de isotipo mAb). Para COV2-2164 (media ± SEM; n = 8, dos experimentos).

**Clonotipos públicos compartidos entre las respuestas vacunales y convalecientes a la proteína SARS-CoV-2 S**

Planteamos la hipótesis de que las vacunas de ARNm contra el SARS-CoV-2 podrían inducir clonotipos públicos que se comparten con los observados en individuos convalecientes después de la infección natural. Obtuvimos células mononucleares de sangre periférica de un voluntario 10 días después de la primera dosis de la vacuna y 7 días después de la segunda dosis de la vacuna con la vacuna de Pfizer-BioNTech. Los plasmablastos circulantes se enriquecieron directamente de la sangre mediante selección negativa utilizando perlas paramagnéticas y se purificaron aún más mediante clasificación citométrica de flujo ([Figuras 6 A y 6B](#)). Los plasmablastos clasificados se cargaron en un instrumento de microfluídica Beacon para la detección de unión a anticuerpos secretados de una sola célula y la secuenciación de genes de anticuerpos o en un dispositivo de microfluídica de una sola célula de cromo (10X Genomics) seguido de transcripción inversa con PCR y análisis de secuencia para obtener secuencias de anticuerpos pareadas, como se describió anteriormente ([Zost et al. 2020b](#)). El análisis del ensayo de inmunospot ligado a enzimas (ELISpot) reveló un gran aumento en la frecuencia de células S reactivas en la fracción de células plasmablasticas enriquecidas el día 7 después de la segunda vacunación en comparación con la del día 10 después de la primera dosis de la vacuna, confirmando la inducción de respuestas específicas del objetivo en este individuo. SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>-los anticuerpos secretados específicos eran de clases IgG e IgA y representaban el >10% del total de plasmablastos ([Figura 6C](#)). Además, el análisis de secreción de anticuerpos unicelulares de un total de 4.797 plasmablastos purificados reveló que una gran fracción de clones reactivos al SARS-CoV-2 (incluido el S6P<sub>ecto</sub>- y/o clones reactivos a RBD) secretado IgG específico de RBD ([Figura 6D](#)).



[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 6

Análisis de la respuesta de anticuerpos del donante vacunado

(A y B) Diagramas citométricos de flujo que muestran la estrategia de gating para identificar plasmablastos en la muestra total de PBMC recolectada el día 7 después de la segunda dosis de la vacuna (panel superior) o la identificación de plasmablastos después del enriquecimiento directo de sangre total en el mismo punto de tiempo utilizando selección negativa con perlas paramagnéticas (panel inferior). La flecha azul indica plasmablastos enriquecidos que se

utilizaron para el análisis ELISpot como en (B), y la flecha roja indica plasmablastos ( $\text{DAPI}^- \text{CD19}^{\text{lo}} \text{CD27}^{\text{hola}} \text{CD38}^{\text{hola}}$ ) que fueron clasificados por FACS para la secreción de una sola célula y estudios de secuenciación de anticuerpos pareados.

(C) Análisis ELISpot del SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>-secreción específica de anticuerpos utilizando plasmablastos enriquecidos de sangre recogida el día 10 después de la primera dosis de la vacuna (IgG) y el día 7 después de la segunda dosis de la vacuna (IgG e IgA). A/Darwin/4/2020 La hemaglutinina (HA) del virus de la influenza H1N1 se utilizó como control de la especificidad de la respuesta de los plasmablastos. Pozos con manchas (izquierda) y número de SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>-se muestran las respuestas específicas detectadas (derecha). La línea punteada indica valores por debajo del límite de la detección (LOD = 10 puntos por  $10^4$  células), que se establecieron hasta 5 puntos por cada  $10^4$  células.

(D) Representación de gráficos circulares que muestran la frecuencia de RBD y SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> reactivo (rojo), SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> plasmablastos reactivos solo (verde) o RBD reactivos solo (azules) identificados como en (C). Fracción de células que no reaccionaron ni al SARS-CoV-2 RBD ni al S6P<sub>ecto</sub> se muestra en gris.

(E) Los plasmablastos clasificados por citometría de flujo se cargaron en un instrumento Beacon y se evaluaron para su unión a S6P<sub>ecto</sub> o perlas recubiertas de RBD utilizando análisis de secreción de anticuerpos unicelulares. Se muestran imágenes de campo brillante del chip de instrumento Beacon con plasmablastos individuales cargados en los bolígrafos del chip para los campos de visión seleccionados para cada condición de detección (arriba). Imágenes fluorescentes de color falso de los mismos campos de visión (abajo) que muestran la unión del anticuerpo antihumano marcado con Alexa Fluor 568 a la S6P<sub>ecto</sub> o cuentas recubiertas de RBD que capturaron anticuerpos humanos secretados por plasmablastos individuales (visualizados como una pluma de las cuentas que se cargaron en el canal del chip). La flecha indica que las células secretan anticuerpos IgG reactivos al antígeno.

(F) ELISA vinculante al SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> del suero del paciente 5 al día 0 de la primera vacunación, el día 10 después de la primera vacunación o el día 7 después de la segunda vacunación se midieron por absorbancia a 450 nm. El suero se diluyó 1:75 y luego se diluyó en serie 3 veces. El experimento se realizó en replicación biológica y triplicado técnico. Se muestra la réplica biológica de un solo experimento representativo, se muestra la media ± SD de triplicados.

(G) Curvas de neutralización del suero del paciente 5 al día 0 de la primera vacunación, al día 10 después de la primera vacunación o al día 7 después de la segunda vacunación. Se utilizó un estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la immunoglobulina humana anti-SARS-CoV-2 como control positivo. El suero se diluyó a partir de una dilución de 1:25, luego se diluyó en serie 2 veces. El experimento se realizó por triplicado técnico.

(H) Gráfico de Circos que indica los clonotipos públicos identificados en este documento. Las cintas más opacas dentro del círculo representan clonotipos públicos que se comparten entre el donante vacunado y los donantes convalecientes después de la infección natural. Las cintas translúcidas indican clonotipos públicos compartidos entre individuos convalecientes de infección. Los individuos de los que se derivaron las secuencias se indican en el círculo interno. Las fuentes publicadas de las que se obtuvieron las secuencias se muestran en el segundo círculo. El círculo exterior indica si los individuos estaban naturalmente infectados o vacunados.

También analizamos la reactividad y neutralización de anticuerpos en suero recolectado el día antes de la vacunación (día 0), el día 10 después de la primera dosis de la vacuna, el día 7 después de la segunda dosis de la vacuna y el día 28 después de la segunda dosis de la vacuna. La reactividad de los anticuerpos séricos contra ambos SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub> y la RBD del SARS-CoV-2 se midió mediante ELISA para su unión ([Figura 6F](#)) y mediante ensayo neutralizador VSV-SARS-CoV-2 ([Figura 6G](#)). Las actividades

de unión y neutralización aumentaron constantemente con el tiempo, con la actividad máxima detectada el día 28 después de la segunda dosis de la vacuna.

Obtuvimos 725 secuencias pareadas de cadenas pesadas y ligeras de plasmablastos después de la inmunización primaria y 8.298 secuencias pareadas de plasmablastos después de la segunda dosis de la vacuna. El mismo procedimiento se llevó a cabo en una muestra recogida 35 días después del inicio de los síntomas de un individuo convaleciente con infección confirmada por SARS-CoV-2. Se había determinado previamente que el suero de este individuo contenía anticuerpos neutralizantes ([Zost et al., 2020b](#)). El análisis de secreción de anticuerpos unicelulares reveló que una fracción menor (0,5%) del total de plasmablastos produjo anticuerpos reactivos a la proteína S. Identificamos 1.883 secuencias de anticuerpos de cadena pesada y ligera emparejadas de este espécimen.

Las secuencias de anticuerpos identificadas en estos nuevos estudios y las secuencias que recopilamos de estudios previos de descubrimiento de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 se agruparon como se describe en [Figura 1](#). Se identificaron un total de 37 clonotipos públicos, 26 de los cuales representaban clonotipos compartidos entre anticuerpos aislados del vacunado e individuos con antecedentes de exposición a la infección natural por SARS-CoV-2 ([Figura 6H](#)). La especificidad de unión a antígenos de cada grupo se dedujo a través de la revisión de los datos en cada publicación respectiva en la que se informaron los anticuerpos. Catorce de los 26 clonotipos compartidos recientemente identificados codificaron anticuerpos específicos para la proteína SARS-CoV-2 S. Dentro de ese panel de mAbs, 8 de los 26 clonotipos reaccionaron con la proteína RBD del SARS-CoV-2, y 6 de los 26 clonotipos públicos reaccionaron de forma cruzada con el SARS-CoV-1 y el SARS-CoV-2 ([Figura 7](#)). La mayoría de los anticuerpos compartidos en los clonotipos públicos fueron IgG, con un subconjunto de IgA observado. Este hallazgo muestra que la vacuna de Pfizer-BioNTech induce muchos anticuerpos que son genéticamente similares a los provocados a través de la infección natural por SARS-CoV-2, incluidos múltiples clonotipos públicos en donantes convalecientes codificados por V de uso común.<sub>H</sub> genes, como *IGHV3-53*, *IGHV3-66*, *IGHV1-58*, *IGHV3-30e* *IGHV3-30-3*. Además, de los 37 clonotipos públicos totales, 16 unidos a RBD, y de estos, 11 de 16 fueron neutralizantes. Todos los clonotipos públicos neutralizantes reconocieron RBD. Sin embargo, de los 37 clonotipos públicos identificados, 21 están dirigidos a sitios antigenicos distintos de la RBD, incluidos los descritos aquí dirigidos al dominio S2. En general, estos resultados sugieren que muchos de los clonotipos públicos observados en individuos previamente infectados probablemente se encuentran en individuos vacunados.

Public clonotype number	Heavy chain		Light chain		Predicted Functional Profile					Isotype of clones	Shared between vaccinated & infected	Donors sharing public clone	Publication from which reactivity data originated		
	IGHV	IGHJ	IGLV	IGLJ	IGKV	IGKJ	CDRH3 length	Spike reactivity	SARS-CoV-2 RBD binding	SARS-CoV binding	Neutralization of SARS-CoV-2				
1	3-7	4	3-1	3	-	-	12					IgG	Patient 3/4, Patient 2	Zost et al.	
19	3-7	4	3-1	1	-	-	12					IgG	Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.	
20	3-7	4	3-1	2	-	-	12					IgG	Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.	
29	3-7	3	-	-	2-30	2	15	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG, IgA	Patient 3/4, Patient 5	This paper	
2	1-69	4	-	-	3-11	4	15					IgG	CC121, Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.	
23	1-69	4	-	-	3-11	4	15					IgG	COVA2, Patient 5	Brouwer et al.	
3	4-69	3	6-67	2	-	-	12					IgG	COV107, Patient 3/4	Zost et al.	
4	3-53	4	-	-	3-11	1	11					IgG	COV21, COV107, CC121, Patient 5	Roger et al., Robbiani et al.	
14	3-53	6	-	-	3-10	1	9						COVA2, COV96	Brouwer et al.	
31	3-53	4	-	-	3-10	5	11	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV107, Patient 5	This paper	
16	3-53	3	-	-	1-9	2	11					IgG	Cardian, Patient 5	Zost et al.	
13	3-53	6	-	-	1-9	3	11					IgG	Patient 5, CC12	Rogers et al.	
8	3-53	6	-	-	1-9	3	11					IgG	Patient 1, Patient 5	Li et al.	
36	3-53	6	-	-	1-9	2	11	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV72, Patient 5	This paper	
37	3-53	6	-	-	1-9	5	11	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV96, Patient 5	This paper	
11	3-53	3	1-40	2	-	-	16					IgG	Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.	
5	3-9	4	3-67	1	-	-	14						CC8, COV107	Rogers et al.	
6	3-30	4	-	-	1-5	1	20					IgG	Patient 5, COV107, COV96	Robbiani et al.	
15	3-30	4	-	-	1-33	3	20					IgG	Patient 3/4, Patient 5, COV107, COV72	Zost et al.	
21	3-30	3	-	-	3-1	2	14					IgG	Patient 2, Patient 3/4	Zost et al.	
25	3-30	3	-	-	3-1	2	14					N/A	IgG	Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.
22	3-30	6	1-40	1	-	-	19					IgG	Patient 3/4, Patient 5	Zost et al.	
33	3-30	4	6-67	2	-	-	16	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV96, Patient 5	This paper	
7	1-69	3	-	-	1-9	1	16					IgG	COV72, COV107, Patient 3/4	Zost et al.	
9	1-69	3	-	-	1-9	1	16						MicroBSP1, COV21, COV96, COV107	Kroer et al., Robbiani et al.	
10	3-66	6	-	-	1-9	5	11					IgG	Patient 3/4, COV96	Zost et al., Robbiani et al.	
12	3-30-3	4	3-14	3	-	-	14						COV41, COV107	Brouwer et al., Robbiani et al.	
18	3-30-3	4	6-67	3	-	-	17					IgG	COV72, Patient 5	Robbiani et al.	
34	3-30-3	4	-	-	3-1	13	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV21, Patient 5	This paper	
17	4-31	4	-	-	3-28	4	15					IgG	COV21, Patient 5	Robbiani et al.	
24	3-21	3	-	-	3-15	1	20					N/A	IgG, IgA	COV41, Patient 5	Brouwer et al.
28	3-21	4	-	-	1-9	4	11	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG, IgA	Patient 2, Patient 5	This paper	
26	1-8	4	6-45	1	-	-	10	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG, IgA	Patient 3/4, Patient 5	This paper	
27	1-46	5	3-19	3	-	-	15	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG, IgA	Patient 3/4, Patient 5	This paper	
30	3-11	4	6-67	3	-	-	12	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV21, Patient 5	This paper	
32	4-59	5	1-67	3	-	-	15	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV57, Patient 5	This paper	
35	3-48	6	-	-	1-39	1	16	N/A	N/A	N/A	N/A	IgG	COV96, Patient 5	This paper	

[Abrir en una ventana separada](#)

Figura 7

Identificación de clonotipos públicos compartidos entre individuos infectados naturalmente y un donante vacunado

Tabla que muestra todos los clonotipos públicos identificados. El uso de genes para cada clon o longitud de CDRH3 se muestra en las columnas 2 o 3. Los perfiles de reactividad obtenidos de fuentes publicadas se muestran con fines comparativos. El azul indica reactividad positiva, mientras que el blanco indica que no se detectó reactividad de unión o neutralización. El gris indica que el perfil de reactividad no se encontró en ninguna de las publicaciones y, por lo tanto, se desconoce. Los isotipos de anticuerpos en cada grupo se enumeran en la octava columna. Si el grupo contenía secuencias de individuos vacunados e infectados, se denotaba en amarillo. El blanco se utilizó para los clonotipos que se compartieron solo entre individuos convalecientes después de una infección natural.

Vete a:

## Discusión

El alto número de clonotipos públicos de células B identificados en la respuesta a la **infección por SARS-CoV-2 o la vacunación es sorprendente. Muchos clonotipos** públicos se comparten entre individuos infectados y vacunados. Los clonotipos públicos fueron inducidos por cada uno de los sitios antigenicos actualmente conocidos en la proteína S y se encuentran tanto en los repertorios neutralizantes como no neutralizantes. Algunos clonotipos en la respuesta compartida del SARS-CoV-2 aparecen preconfigurados en el estado de la línea germinal para reconocer epítopos S particulares, y este reconocimiento probablemente esté impulsado por características estructurales particulares en S. En este estudio, comparamos las secuencias de más de 14,000 secuencias de células B emparejadas que codifican anticuerpos contra la proteína S del SARS-CoV-2. Probablemente, la disponibilidad de un gran número de secuencias de genes de anticuerpos pareados de una multitud de donantes contribuyó a nuestra capacidad para identificar un número tan alto de clonotipos públicos de secuencia pareada.

Se han identificado previamente varios clonotipos públicos neutralizantes, más comúnmente clonotipos codificados por los genes de cadena pesada estrechamente relacionados *IGHV3-53*, *IGHV3-66* ([Tan et al., 2021; Yuan et al., 2020a](#)), *IGHV1-2* ([Rapp et al., 2021](#)), e *IGHV3-30* ([Robbiani et al., 2020](#)). Las características estructurales de estos clonotipos públicos probablemente impulsan la selección frecuente de tales clones, como la configuración canónica de los residuos aromáticos en el clonotipo público *IGHV1-58 + IGHJ3* e *IGKV3-20 + IGKJ1* que involucra el residuo SARS-CoV-2 RBD F486 ([Dong et al., 2021](#)). Los miembros de este clonotipo público, como COV2-2196, activan la RBD utilizando predominantemente residuos codificados en la línea germinal tanto en la cadena pesada como en la ligera ([Dong et al., 2021; Kreer et al., 2020; Nielsen et al., 2020; Robbiani et al., 2020; Tortorici et al., 2020](#)). La identificación de clonotipos públicos de múltiples donantes sugiere que estos anticuerpos podrían contribuir a las respuestas humorales que median la protección si aparecen no solo en las células B de memoria, sino también como anticuerpos de células plasmáticas secretadas en el suero ([Voss et al., 2020](#)). La alta prevalencia de clonotipos públicos provocados en el trímero S del SARS-CoV-2 puede contribuir a la alta eficacia de las vacunas de ARNm codificantes en S en grandes poblaciones.

Si diversos individuos producen independientemente el mismo anticuerpo en respuesta a un antígeno, podría haber una presión selectiva constante y colectiva sobre ese epítopo, lo que resulta en un alto potencial de variantes de escape en ese sitio. Por ejemplo, aunque se han descrito clonotipos públicos codificados en *IGHV3-53* e *IGHV3-66* en numerosos individuos, la neutralización de estos anticuerpos se ve afectada negativamente por las sustituciones K417N o K417T presentes en las variantes de preocupación del SARS-CoV-2 B.1.351 o P.1, respectivamente ([Yuan et al., 2021](#)). Se describió un caso similar para los anticuerpos codificados en *IGHV1-2* que se dirigen a los anticuerpos codificados en RBD e *IGHV1-24* que se dirigen a la NTD. Estos anticuerpos se encuentran en el suero de individuos convalecientes ([Voss et al., 2020](#)), pero la neutralización de estos anticuerpos se ve afectada negativamente para 501Y. V2 variante de virus ([Wibmer et al., 2021](#)). Una posible explicación de la presión selectiva que condujo a la aparición y propagación de estas variantes es la inmunidad humoral mediada por estos clonotipos públicos.

Los nuevos anticuerpos neutralizantes y protectores del clonotipo público del grupo 3 descritos aquí se unen a la cara críptica de la RBD y compiten con el mAb CR3022 no neutralizante del SARS-CoV-2. Los anticuerpos neutralizantes que se unen a la base

**Comentado [MI1]:** Parece que se habla de mimetismo molecular en los clonotipos públicos, que pueden ser ocupados por anticuerpos no neutralizante. ADE. Y FACILITAN LA INFECCION.

más conservada de la RBD son de interés, porque estos sitios no se ven afectados en gran medida por mutaciones comunes en las variantes de preocupación, como E484K, K417N y N501Y ([Yuan et al., 2021](#)). Es importante destacar que trabajos recientes han identificado una variante B.1.1.7 con una delección de residuos RBD 375–377. Esta delección interrumpe el epítopo de CR3022, pero parece ser funcionalmente tolerada ([Rennick et al., 2021](#)). Debido a que los anticuerpos del grupo 3 comparten un epítopo similar, con residuos críticos de COV2-2531 y C126 que son K378 y A372, pero con residuos críticos adicionales de Y369, N370, F374 y P384 identificados para C126, esta delección podría abrogar la unión de anticuerpos de este clonotipo público. La caracterización de anticuerpos del grupo 3 revela información adicional sobre la unión de anticuerpos a epítopos similar a la de CR3022. La literatura publicada recientemente sugiere que existe un umbral de avidez que afecta la neutralización de anticuerpos en la cara críptica de la RBD ([Wu et al., 2020](#)). Planteamos la hipótesis de que las mejoras de afinidad a través de la hipermutación somática juegan un papel importante en la capacidad de COV2-2531 para neutralizar, particularmente porque ni C126 ni el revierte de la línea germinal del grupo 3 neutralizan el virus.

Hasta donde sabemos, no se han descrito clonotipos públicos específicos del dominio S2. En este estudio, identificamos dos clonotipos públicos que se dirigen al dominio S2 del trímero S. Estos mAbs no neutralizan, pero reaccionan con proteínas S tanto del SARS-CoV-2 como del SARS-CoV-1. Es probable que estos epítopos S2 sean el objetivo de anticuerpos no neutralizantes en múltiples individuos después de la infección o la vacunación. Estudios previos han identificado epítopos ampliamente inmunogénicos que se conservan en los dominios funcionales del dominio S2 del trímero S2 del SARS-CoV-2, incluida la reactividad cruzada a los coronavirus endémicos, y por lo tanto estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el diseño de anticuerpos y vacunas ([Ladher et al., 2021](#)). La región S2 del trímero S puede ser más capaz de reclutar células B de memoria preexistentes para diversos coronavirus, porque el dominio S2 está más conservado para sitios funcionalmente importantes como las regiones de repetición heptad y el bucle de fusión ([Anderson et al., 2021](#)).

**Proponemos que hay esencialmente cuatro clases de clonotipos públicos: (1) clonadores públicos neutralizantes que se unen a sitios relativamente invariantes en S, (2) clonotipos públicos neutralizantes que se unen a sitios que toleran una alta variabilidad de secuencia, (3) clonotipos públicos no neutralizantes que se dirigen a sitios relativamente invariantes, y (4) anticuerpos públicos no neutralizantes que se dirigen a sitios variables.** La primera clase de anticuerpos es probablemente la clase más protectora en una población, porque estos mAbs neutralizan y reconocen residuos que es poco probable que se mantengan con mutaciones debido a la pérdida de la aptitud viral. Un ejemplo de esta clase serían los anticuerpos codificados *igHV1-58* como se describió anteriormente ([Dong et al., 2021](#)). Muchos clones públicos actualmente identificados para el SARS-CoV-2 se clasifican en la segunda clase. Si bien estos clones inicialmente ofrecen protección, esta propiedad podría perderse a medida que se ejerce una presión selectiva generalizada sobre el virus en una región con plasticidad genética y estructural. Aquí se discutieron ejemplos de este grupo, como los anticuerpos codificados *IGHV3-53-* e *IGHV3-66* que se dirigen a la RBD ([Yuan et al., 2021](#)). Aquí, describimos tres nuevos clonotipos públicos después de la infección natural (grupos 1, 2 y 3) y un total de 29 nuevos clonotipos después de la vacunación con ARNm. Los grupos de clonotipos públicos 1 y 2 pertenecen a la tercera clase de anticuerpos descritos aquí (anticuerpos no neutralizantes que se dirigen a sitios invariantes), y los anticuerpos públicos del grupo 3 del clonotipo caen en la segunda clase (clonotipos

públicos neutralizantes que se unen a sitios variables). Los futuros clonotipos públicos del SARS-CoV-2 podrían unirse a este esquema de cuatro cuadrantes para comprender mejor cómo los clonotipos públicos contribuyen a la inmunidad humoral contra la COVID-19.

Comprender la respuesta de anticuerpos que se comparte entre los individuos convalecientes y vacunados también será de interés continuo a medida que aumente el porcentaje de individuos vacunados ante la aparición de nuevas variantes virales preocupantes. La comprensión de los epítopos virales que inducen anticuerpos protectores en múltiples individuos tiene implicaciones para predecir las respuestas más comunes a las nuevas vacunas en grandes poblaciones. La aparición de variantes del SARS-CoV-2 con mutaciones adquiridas en epítopos para anticuerpos neutralizantes, incluidos los regímenes de anticuerpos actualmente autorizados para EUA, es motivo de preocupación (Collier et al., 2021; Tegally et al., 2020; Wang et al., 2021a, 2021b). Nuestros análisis de clonotipos públicos después de la infección natural y la vacunación y sus objetivos de epítopo compartidos pueden predecir sitios de futuros cambios antigenéticos importantes en el trímero S.

Vete a:

## STAR★Métodos

### Tabla de recursos clave

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
<b>Anticuerpos</b>		
COV2-2196	<a href="#">Zost et al., 2020a</a>	N/A
COV2-2130	<a href="#">Zost et al., 2020a</a>	N/A
COV2-2490	<a href="#">Zost et al., 2020b</a>	N/A

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
COV2-2676	<a href="#">Zost et al., 2020b</a>	N/A
CR3022	<a href="#">Dingens et al., 2020</a>	N/A
r2D22	<a href="#">Smith et al., 2012</a>	N/A
COV2-2002	Este documento	N/A
COV2-2333	Este documento	N/A
COV2-2164	Este documento	N/A
CnC2t1p1_B10	<a href="#">Kreer et al., 2020</a>	N/A
COV2-2531	Este documento	N/A
C126	<a href="#">Robbiani et al., 2020</a>	N/A
Cabra anti-humana IgG Fc, Anuncios multiespecie-HRP	Biotecnología del Sur	Modelo: 2014-05

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
Cabra anti-humana IgG Alexa Fluor 647	Invitrogeno	Modelo: A-21445
Enzima convertidor de angiotensina-2, ACE-2	Sigma-Aldrich	Modelo: SAE0064
Monoclonal ANTI-FLAG M2- Peroxidasa HRP	Sigma-Aldrich	Modelo: A8592
Anticuerpo anti-S2 1A9	Genetex	Modelo: GTX632604
<b>Cepas bacterianas y de virus</b>		
VSV-SARS-CoV-2	<a href="#">Caso et al., 2020b</a>	N/A
VSV-SARS-CoV-2 D614G	<a href="#">Caso et al., 2020b</a>	N/A
VSV-SARS-CoV-1	<a href="#">Caso et al., 2020b</a>	N/A

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
SARS-CoV-2 D614G	<a href="#">Plante et al., 2021</a>	N/A
SARS-CoV-2 (cepa 2019 n-CoV/USA_WA1/2020)	Recursos de CDC/BEI	NR52281
SARS-CoV-2 (aislado B.1.1.7)	<a href="#">Chen et al., 2021</a>	N/A
SARS-CoV-2 (aislado B.1.429)	<a href="#">Chen et al., 2021</a>	N/A
SARS-CoV-2 (aislado B.1.1.298)	<a href="#">Chen et al., 2021</a>	N/A
SARS-CoV-2 (aislado B.1.1.28)	<a href="#">Chen et al., 2021</a>	N/A
<b>Muestras biológicas</b>		
Plasmablastos de un vacunado contra el SARS-CoV-2	Este documento	N/A

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
<b>Productos químicos, péptidos y proteínas recombinantes</b>		
SARS-CoV-2 S6P <sub>ecto</sub>	<a href="#">Greaney et al., 2021</a>	N/A
Avidina-peroxidasa	Sigma	Modelo: A3151
Solución de sustrato Ultra TMB-ELISA de 1 paso	Thermo Fisher Científico	Modelo: 34029
Medio de expresión ExpiCHO	Thermo Fisher Científico	Modelo: A2910001
Medio de expresión FreeStyle 293	Thermo Fisher Científico	Modelo: 1238002
Suero fetal bovino, IgG ultra baja	Thermo Fisher Científico	Modelo: 16250078

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
EZ-Link NHS-PEG4-Biotina, formato sin pesaje	Thermo Fisher Científico	Modelo: A39259
FabALACTICA® Kit Fab	Genovis	Modelo: A2-AFK-025
Solución de bloqueo de biotina BioLock	IBA Ciencias de la Vida	Modelo: 2-0205-050
Formiato de uranilo	EMS	Modelo: CF400-CU-50
<b>Datos depositados</b>		
Deposición de archivo de lectura de secuencia para los clonotipos públicos identificados	Este documento	NCBI: PRJNA511481
Secuencias pareadas de plasmablastos de cadena pesada y ligera, que se identificaron como clonotipos	Este documento	Números de acceso de GenBank <a href="#">MZ555491</a> a través de <a href="#">MZ555628</a>

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
públicos, después de la vacunación con ARNm		
Secuencias de COV2-2164	Este documento	Números de acceso de GenBank <a href="#">MZ555629</a> y <a href="#">MZ555630</a>
<b>Modelos experimentales: Líneas celulares</b>		
Mono: Vero E6	Colección American Type Culture	CRL-1586, RRID: CVCL_0574
Mono: Vero E6 +TMPRSS2	Laboratorio de diamantes	N/A
Mono: Vero E6 + ACE2 + TMPRSS2	A. Creanga y B. Graham (Centro de Investigación de Vacunas, NIH)	N/A

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
Mono: Vero CCL-81	Colección American Type Culture	CCL-81; RRID: CVCL_0059
Mono: Vero Furin	<a href="#"><u>Mukherjee et al., 2016</u></a>	N/A
Mono: MA104	Colección American Type Culture	CRL-2378.1
Calu-3	Laboratorio Thorne	N/A
Hámster: ExpiCHO-S	Thermo Fisher Científico	Cat# A29127, RRID: CVCL_5J31
Humano: FreeStyle 293-F	Thermo Fisher Científico	Gato# <a href="#"><u>R79007</u></a> , RRID: CVCL_D603
Humano: HEK293T	Colección American Type Culture	CRL-3216
Humano: HEK293T + ACE2	Laboratorio de diamantes	N/A

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Humano: HEK293	Colección American Type Culture	CRL-1473
<b>Modelos experimentales: Organismos/Cepas</b>		
Ratón: B6. Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J	Laboratorio Jackson	Cat# 034860; RRID: IMSR_JAX:03486
<b>ADN recombinante</b>		
Plásmido: pTwist-CMV S6P <sub>ecto</sub>	<a href="#">Greaney et al., 2021</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2196	<a href="#">Zost et al., 2020a</a>	N/A

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2130	<a href="#">Zost et al., 2020a</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2490	<a href="#">Zost et al., 2020b</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2676	<a href="#">Zost et al., 2020b</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 rCR3022	<a href="#">Dingens et al., 2020</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 r2D22	<a href="#">Smith et al., 2012</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2002	Este documento	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2333	Este documento	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2164	Este documento	N/A

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
Plásmido: pTwist-mCis_G1 CnC2t1p1_B10	<a href="#">Kreer et al., 2020</a>	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 COV2-2531	Este documento	N/A
Plásmido: pTwist-mCis_G1 C126	<a href="#">Robbiani et al., 2020</a>	N/A
<b>Software y algoritmos</b>		
RTCA versión 2.1.0	Acea Biociencias, Inc.	Software RTCA, RRID: <a href="#">SCR_014821</a>
Serie EM 3.7	D.N. Mastronarde	SerialEM, RRID: <a href="#">SCR_017293</a>
Topacio 0.2.3	<a href="#">Bepler et al., 2019, Bepler et al., 2020</a>	Topacio

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
UCSF Quimera 1.14	<a href="#">Pettersen et al., 2004</a>	UCSF Quimera, RRID: <a href="#">SCR_004097</a>
Cryosparc 3.0.0	<a href="#">Punjani et al., 2017</a>	RRID: <a href="#">SCR_016501</a>
FlowJo	FlowJo, LLC	v10
Canalización computacional para el análisis de clustering	Este documento	Zenodo; DOI <a href="#">10.5281/zenodo.5150784</a>
Script para crear mapas de calor	Este documento	Zenodo; DOI <a href="#">10.5281/zenodo.5150784</a>
Script PyIR utilizado para determinar las características de secuencia de cada anticuerpo	Este documento	Zenodo; DOI <a href="#">10.5281/zenodo.5150784</a>
Prisma GraphPad	GraphPad	v 9.0.0
Software iQue® Forecyt®	Sartorio	N/A
Patología digital del nanozoómero	Hamamatsu	v2

<b>REACTIVO o RECURSO</b>	<b>FUENTE</b>	<b>IDENTIFICADOR</b>
<b>Otro</b>		
Analizador xCELLigence RTCA MP	Acea Biociencias, Inc.	N/A
xCELLigence E-Plate 96 placas de cultivo celular PET	Acea Biociencias, Inc.	Cat# 300601010
Sistema de cromatografía pura ÄKTA	GE Healthcare Ciencias de la Vida	N/A
Apilador de microplacas Biostack	BioTek	N/A
Microscopio electrónico FEI TF20 con cámara CCD Gatan US4000 4k × 4k	Thermo Fisher Científico	N/A
Columna StrepTrap HP	GE Healthcare Ciencias de la Vida	Nº de gato 28-9075-48

REACTIVO o RECURSO	FUENTE	IDENTIFICADOR
Rejillas EM de cobre de 400 mallas	Servicios de microscopía electrónica	Cat# 22451
Lavadora dispensadora EL406	BioTek	N/A
Columna HisTrap Excel	GE Healthcare Ciencias de la Vida	Cat# 17-3712-06
Columna HiTrap MabSelect SuRe 5 mL	GE Healthcare Ciencias de la Vida	Cat# 29-0491-04
Intellicyt iQue Screener Plus	Sartorio	N/A
ImmunoSpot S6 Plate Imager	Tecnología Celular Limitada	N/A

[Abrir en una ventana separada](#)

### Disponibilidad de recursos

### Contacto con el cliente potencial

La información adicional y las solicitudes de recursos y reactivos deben dirigirse y serán cumplidas por el contacto principal, James. E. Crowe, Jr.  
[\(james.crowe@vumc.org\)](mailto:james.crowe@vumc.org)

### Disponibilidad de materiales

Los materiales descritos en este documento están disponibles para su distribución para uso sin fines de lucro utilizando documentos con plantillas de la Asociación de Gerentes

de Tecnología Universitaria "Toolkit MTAs", disponibles en: <https://autm.net/surveys-and-tools/agreements/material-transfer-agreements/mta-toolkit>.

## Modelo experimental y detalles del tema

### Participantes de la investigación

Estudiamos a tres pacientes (paciente 2 [mujer de 52 años], 3 [hombre de 56 años] y 4 [mujer de 56 años]) en América del Norte con infecciones sintomáticas de SARS-CoV-2 confirmadas por laboratorio que hemos descrito anteriormente ([Zost et al., 2020b](#)). Estudiamos a un paciente (varón de 59 años) que recibió la vacuna de Pfizer-BioNTech. Los estudios fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico de la Universidad de Vanderbilt.

### Líneas celulares

Las células Vero E6 (ATCC, CRL-1586) se mantuvieron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% en el medio esencial mínimo (DMEM) de Dulbecco que contiene 10% de suero fetal bovino inactivado con calor (FBS), 10 mM HEPES pH 7.3, 1 mM de piruvato de sodio, 1 × aminoácidos no esenciales y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. Las células ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, A29127) se mantuvieron a 37°C en 8% de CO<sub>2</sub> en medio de expresión ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, A2910002). Las pruebas de micoplasma de líneas celulares se realizaron mensualmente utilizando un kit de detección de micoplasma basado en PCR (ATCC, 30-1012K), con resultados negativos en cada prueba. Las células calu-3 (ATCC, HTB-55) se mantuvieron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% en DMEM con alto contenido de glucosa y L-glutamina (GIBCO 11965092), que contiene suero fetal bovino inactivado al 10% de calor (FBS) y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. Células Vero-TMPRSS2 ([Zang et al., 2020](#)) se cultivaron a 37°C en el medio Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 10 mM HEPES pH 7.3, 1 mM piruvato de sodio, 1 × aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina y 5 µg/mL de blasticidina.

### Virus

La generación de una proteína VSV S que expresa SARS-CoV-2 S competente para la replicación con una delección C-terminal de 21 aminoácidos que reemplaza a la proteína VSV G (VSV-SARS-CoV-2) se describió anteriormente ([Caso et al., 2020b](#)). El virus VSV que expresa la proteína S se propagó en monocapas de cultivo celular MA104 (mono verde africano, ATCC CRL-2378.1) ([Caso et al., 2020b](#)). Las existencias virales se titularon en cultivos monocapa de células Vero E6 mediante la visualización de placas de VSV utilizando tinción roja neutra. VSV-SARS-CoV-2/D614G fue introducido por mutagénesis dirigida al sitio. El aislado 2019n-CoV/USA\_WA1/2019 de SARS-CoV-2 se obtuvo de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de EE. Las poblaciones infecciosas se propagaron inoculando células Vero CCL81. El sobrenadante fue ali cotizado y almacenado a -80°C. El grupo de la Universidad de Arizona obtuvo el aislado USA-WA1/2020 de SARS-CoV-2 de WRCEVA. El stock de virus de paso temprano se generó por un solo pasaje en Vero CCL81 durante 48 h. El lisato celular infectado y el sobrenadante de cultivo se combinaron, se sometieron a una congelación-descongelación y luego se centrifugaron a restos de células de pellets. El stock se tituló a ~3 x10<sup>6</sup> PFU/mL mediante ensayo de placa estándar en células Vero CCL81. La secuenciación de nanoporos de estos primeros pasajes confirmó que la secuencia del

genoma era idéntica a la secuencia GenBank WA1/2020 ([MN985325.1](#)), sin mutaciones en el sitio de escisión de la furina espiga. Todo el trabajo con EL SARS-CoV-2 infeccioso se realizó en instalaciones BSL3 o A-BSL3 aprobadas por el Comité Institucional de Bioseguridad en la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington o la Universidad de Arizona, utilizando respiradores de aire de presión positiva apropiados y equipos de protección. Las cepas recombinantes WA1/2020 con sustituciones (D614G o N501Y/D614G) o un gen de espiga química (B.1.1.28) se obtuvieron a partir de un clón infeccioso de ADNc de la cepa 2019-n-CoV/USA\_WA1/2020, como se describió anteriormente ([Plante et al., 2021](#)). Los aislados B.1.1.7, B.1.429 y B.1.1.298 se obtuvieron a partir de hisopos nasofaríngeos, y todos los virus se pasaron una vez en las células Vero-TMPRSS2 y se sometieron a secuenciación de próxima generación como se describió anteriormente ([Chen et al., 2021](#)) para confirmar la introducción y estabilidad de las sustituciones. Las sustituciones para cada variante fueron las siguientes: B.1.1.7: supresión de 69 y 70 y 144 y 145, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A y D1118H; B.1.1.28: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y y T1027I; B.1.429: S13I, W152C, L452R y D614G; B.1.1.298: supresión de 69 y 70, Y453F, D614G, I692V y M1229I. Todos los experimentos con virus se realizaron en una instalación aprobada de nivel 3 de bioseguridad.

## Detalles del método

### Agrupación en clústeres para la identificación de clonotipos públicos

Se obtuvieron conjuntos de secuencias pareadas de genes de anticuerpos disponibles públicamente ([Brouwer et al., 2020](#); [Kreer et al., 2020](#); [Liu et al., 2020](#); [Rogers et al., 2020](#); [Seydoux et al., 2020](#); [Wec et al., 2020](#); [Zost et al., 2020b](#)). Junto con las secuencias derivadas de este artículo, los clonotipos públicos se determinaron por similitudes genéticas de secuencias de anticuerpos utilizando el siguiente esquema de agrupación. Las secuencias fueron primero encuadradas por los mismos genes V y J de cadena pesada. Las siguientes secuencias se agruparon de acuerdo con una similitud de secuencia del 70% en su secuencia de nucleótidos CDRH3. Por último, las secuencias se unieron de nuevo si utilizaban los mismos genes V y J de cadena ligera. Se determinó que los grupos de secuencias que contenían secuencias de dos o más donantes eran clonotipos públicos. Esta agrupación nos permitió identificar un total de 11 clonotipos públicos, tres de los cuales no habían sido descritos previamente. A continuación se muestra el número de secuencias que derivamos de cada publicación.

Publicación	Número de secuencias identificadas	Número de clonotipos públicos que son reactivos al SARS-CoV
-------------	---------------------------------------	--

Publicación	Número de secuencias identificadas	Número de clonotipos públicos que son reactivos al SARS-CoV
<a href="#"><u>Kreer et al., 2020, Cell</u></a>	18	
<a href="#"><u>Robbiani et al., 2020, Naturaleza</u></a>	533	2
<a href="#"><u>Rogers et al., Ciencia 2020</u></a>	33	1
<a href="#"><u>Seydoux et al., 2020, Inmunidad</u></a>	32	
<a href="#"><u>Brouwer et al., 2020, Ciencia</u></a>	84	
<a href="#"><u>Hansen et al., 2020, Ciencia</u></a>	8	
<a href="#"><u>Wee et al., 2020, Ciencia</u></a>	54	
<a href="#"><u>Zost et al., 2020b, Medicina de la Naturaleza</u></a>	389	4

### Generación de mapas de calor

Todas las secuencias que se identificaron como clonotipos públicos se analizaron con PyIR ([Soto et al., 2020](#)) para identificar los genes V y J. Se contó el número de secuencias con los genes V y J correspondientes en las cadenas pesadas y ligeras. Estos recuentos de frecuencia se trazaron en el mapa de calor utilizando Python Seaborn Library.

## **Producción y purificación de anticuerpos**

Las secuencias de mAbs se sintetizaron utilizando una plataforma de síntesis rápida de aDNc de alto rendimiento (Twist Bioscience) y posteriormente se clonaron en un vector de expresión monocitrónica IgG1 (designado como pTwist-mCis\_G1) para la secreción de mAb del cultivo celular de mamíferos. Este vector contiene una secuencia 2A mejorada y un enlazador GSG que permite la expresión simultánea de genes mAb de cadena pesada y ligera a partir de una sola construcción tras la transfección ([Chng et al., 2015](#)). Realizamos transfecciones de cultivos celulares ExpiCHO utilizando el sistema de expresión GIBCO ExpiCHO y el protocolo para tubos mini biorreactores de 50 ml (Corning) según lo descrito por el proveedor. Los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando HiTrap MabSelect SuRe (Cytiva, anteriormente GE Healthcare Life Sciences) en un sistema de cromatografía de proteínas paralelas de 24 columnas (Protein Biosolutions). Los anticuerpos monoclonales purificados se intercambiaron en PBS, se concentraron utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-4 de 50 kDa (Millipore Sigma) y se almacenaron a 4 ° C hasta su uso.

## **Expresión y purificación del dominio de unión al receptor recombinante (RBD) de la proteína SARS-CoV-2 S**

Para la microscopía electrónica de la proteína S en complejo con formas Fab de mAbs humanos, expresamos una variante de S6P<sub>ecto</sub> proteína que contiene una etiqueta C-terminal Twin-Strep.tag, similar a la descrita anteriormente ([Zost et al., 2020b](#)). La proteína expresada se incubó con BioLock (IBA Lifesciences) y luego se aisló mediante cromatografía de afinidad Strep-tag en columnas StrepTrap HP (GE Healthcare), seguida de cromatografía de exclusión de tamaño en TSKgel G4000SWXL (TOSOH) si es necesario.

## **Ensayos de unión ELISA**

Los pozos de placas de microtitulación de 384 pozos se recubrieron con SARS-CoV-2 S6P recombinante purificado<sub>ecto</sub>, SARS-CoV-2 RBD o SARS-CoV S2P<sub>ecto</sub> a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con leche seca sin grasa al 2% y suero de cabra normal al 2% en DPBS que contenía Tween-20 al 0,05% durante 1 h. Todos los anticuerpos se diluyeron a una concentración de 0,4 µg/ml para los anticuerpos maduros o 5 µg/ml para los anticuerpos revertidos de la línea germinal. Los anticuerpos se diluyeron en diluciones dobles hasta que ya no se detectó la unión. Se detectaron anticuerpos unidos utilizando IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante y sustrato de TMB. La reacción se apagó con ácido clorhídrico 1N una vez que se desarrolló el color. La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Biotek).

## **Ensayo de visualización de抗ígenos de superficie celular**

Las monocapas de células verográficas se monitorizaron hasta un 80% de confluencia y luego se inocularon con VSV-SARS-CoV-2 V (cepa WA1/2020) a un MOI de 0,5 en medio de cultivo (DMEM con 2% FBS). Para un matraz T-225, se agregaron 10 ml de virus VSV-SARS-CoV-2 diluido a la monocapa, luego se incubaron durante 40 min. Durante la incubación, el matraz se balanceó suavemente hacia adelante y hacia atrás cada 10 minutos para garantizar una infección uniforme. Despues, la incubación del volumen del matraz se remató a 30 ml con un 2% de FBS que contenía DMEM y se

incubó durante 14 h. Las células fueron monitoreadas para CPE bajo un microscopio, fueron trisnizadas y lavadas en tampón de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se sembraron 100.000 células infectadas por pozo para teñirse con los anticuerpos respectivos. Todos los anticuerpos se diluyeron a 10 µg / ml en el tampón FACS, y luego se diluyeron en serie 3 veces 7 veces para teñir los anticuerpos que reaccionan a la proteína S mostrada en la superficie celular. Las células infectadas se resuspendieron en 50 µL de anticuerpo diluido. La unión a anticuerpos se detectó con anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor-647 anti-IgG. Las células se analizaron en un citómetro iQue para la tinción primera mediante la formación de identificar las células infectadas según lo indicado por las células GFP positivas, y luego se fijaron para la unión secundaria de anticuerpos.

#### **Ensayo de neutralización de análisis celular en tiempo real (RTCA)**

Para determinar la actividad neutralizante de los anticuerpos purificados o del suero humano, utilizamos el ensayo de análisis celular en tiempo real (RTCA) en un analizador xCELLigence RTCA MP Analyzer (ACEA Biosciences Inc.) que mide el efecto citopático inducido por virus (CPE) ([Gilchuk et al., 2020](#); [Suryadevara et al., 2021](#); [Zost et al., 2020b](#)). Brevemente, se agregaron 50 µL de medio de cultivo celular (DMEM suplementado con 2% FBS) a cada pozo de una placa E de 96 pozos para obtener una lectura de fondo. Se seeró una suspensión de 18.000 células Vero en 50 µL de medio de cultivo celular en cada pozo, y se colocó la placa en el analizador. Las mediciones se tomaron automáticamente cada 15 minutos, y los sensogramas se visualizaron utilizando el software RTCA versión 2.1.0 (ACEA Biosciences Inc). SARS-CoV-2 S VSV, SARS-CoV-2 S D614G VSV o SARS-CoV-1 (~0.02 MOI, ~120 PFU por pozo) se mezcló 1:1 con una dilución respectiva de mAb o suero humano inactivado por calor en un volumen total de 100 µL usando DMEM suplementado con 2% FBS como diluyente e incubado durante 1 h a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. A las 16 h después de sembrar las células, las mezclas virus-mAb se agregaron en réplicas a las células en placas E de 96 pozos. Se incluyeron como controles los pozos triplicados que contenían virus solamente (CPE máximo en ausencia de mAb) y los pozos que contenían solo células Vero en medio (pozos sin CPE). Las placas se midieron continuamente (cada 15 min) durante 48 h para evaluar la neutralización del virus. Los valores del índice celular (IC) normalizado en el punto final (48 h después de la incubación con el virus) se determinaron utilizando el software RTCA versión 2.1.0 (ACEA Biosciences Inc.). Los resultados se expresan como porcentaje de neutralización en presencia de mAb respectivos en relación con los pozos de control sin valores de CPE menos IC de los pozos de control con CPE máximo. RTCA IC<sub>50</sub> los valores se determinaron mediante análisis de regresión no lineal utilizando el software Prism.

#### **ELISA vinculante para la competencia**

Los pozos de placas de microtitulación de 384 pozos se recubrieron con SARS-CoV-2 S6P recombinante purificado<sub>ecto</sub> proteína a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en DPBS que contenía 0,05% Tween-20 durante 1 h. Cada anticuerpo se diluyó a una concentración de 10 µg/ml. A continuación, los anticuerpos biotinilados se diluyeron a 2,5 µg/ml y se añadieron a la solución primaria de anticuerpos sin lavar la placa a una concentración final de 0,5 µg/ml. La unión a anticuerpos biotinilados se detectó con avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma) y se desarrolló con TMB. La reacción se apagó

con ácido clorhídrico 1N una vez que se desarrolló el color. La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro.

### **Ensayo de bloqueo ACE2**

Los pozos de placas de microtitulación de 384 pozos se recubrieron con SARS-CoV-2 S6P recombinante purificado proteína a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 2% en DPBS que contenía 0.05% Tween-20 durante 1 h. Cada anticuerpo se diluyó a una concentración de 10 µg/ml. A continuación, la proteína ACE2 humana recombinante con una etiqueta FLAG C-terminal se diluyó a 2 µg / ml y se agregó a la solución de anticuerpos sin lavar la placa a una concentración final de ACE2 de 0.4 µg / ml. La unión a ACE2 se detectó utilizando anticuerpos anti-FLAG conjugados con HRP y se desarrolló con sustrato TMB. La reacción se apagó con ácido clorhídrico 1 N una vez que se desarrolló el color. La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro.

### **Ensayo de neutralización por tinción de dsRNA**

Las células Calu-3 se sembraron a 5.000 células por pozo en placas negras SCREENSTAR de 384 pozos (Greiner) y se les permitió adherirse durante la noche. Luego, las células fueron tratadas con anticuerpos en 12 concentraciones que abarcan de  $5,65 \times 10^{-5}$  µg/mL a 10 µg/mL y transferidos inmediatamente a una instalación BSL-3 donde fueron inoculados con SARS-CoV-2 a un MOI aproximado de 1 PFU/célula en medio de 50 µL, e incubados durante 48 h. Al final de la incubación, las placas se sumergieron en PBS con solución de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% durante 30 minutos para fijar. Las células luego se permeabilizaron con Triton X-100 / PBS al 0.2% durante 10 min y se bloquearon con BSA / PBS al 5% durante 1 h. La solución primaria de anticuerpos anti-dsRNA (Scicons #10010500) a una dilución de 1: 1,000 se colocó en las células durante la noche a 4 ° C. Las células se lavaron con 0.1% Tween-20 / PBS (PBST) tres veces y las placas se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra Alexa Fluor-546 marcado con dilución 1: 1,000 (Thermo Fisher Scientific) durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las placas se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con DAPI durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se fotografió las placas con microscopía fluorescente en un sistema de microscopía automatizada Nikon Eclipse TI2 con un objetivo de 20 ×. Se tomaron imágenes de seis fotogramas por pozo y la intensidad de fluorescencia de dsRNA, normalizada al recuento de células por DAPI, se midió mediante el software de imágenes Nikon Elements.

### **Prueba de neutralización de reducción de enfoque**

Las diluciones seriadas de mAbs (a partir de una dilución de 10 µg/mL) se incubaron con 100 FFU de diferentes cepas de SARS-CoV-2 durante 1 h a 37 °C. Se agregaron complejos anticuerpo-virus a monocapas celulares Vero-TMPRSS2 en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, las células se superpusieron con metilcelulosa al 1% (p/v) en MEM. Las placas se recogieron 30 h más tarde mediante la eliminación de superposiciones y se fijaron con 4% de PFA en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron e incubaron secuencialmente con un grupo oligoclonal de SARS2-2, SARS2-11, SARS2-16, SARS2-31, SARS2-38, SARS2-57 y SARS2-71 ([Caso et al., 2020a](#)) anticuerpos anti-S e IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (Sigma, 12-349) en PBS suplementado con saponina al 0,1% y

albúmina sérica bovina al 0,1%. Los focos celulares infectados por SARS-CoV-2 se visualizaron utilizando sustrato de peroxidasa TrueBlue (KPL) y se cuantificaron en un microanalizador ImmunoSpot (Cellular Technologies).

### **Experimentos con ratones**

Los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington (número de garantía A3381-01). Las inoculaciones del virus se realizaron bajo anestesia que fue inducida y mantenida con clorhidrato de ketamina y xilazina, y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. Ratones heterocigotos K18-hACE c57BL/6J (cepa: 2B6. Cg-Tg(K18-ACE2)2Prln/J) se obtuvieron del Laboratorio Jackson. Los animales fueron alojados en grupos y alimentados con dietas estándar de chow. Un día antes de la infección, los ratones recibieron una dosis única de 200 µg de COV2-2351 o COV2-2164 por inyección intraperitoneal. A ratones de ocho a nueve semanas de edad se les administró  $10^3$  PFU del SARS-CoV-2 por administración intransal.

### **Medición de la carga viral en tejidos de ratón**

Los tejidos se pesaron y homogeneizaron con perlas de zirconia en un instrumento MagNA Lyser (Roche Life Science) en 1.000 µL de medio DMEM suplementado con FBS inactivado por calor al 2%. Los homogeneizados de tejidos se clarificaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min y se almacenaron a -80 °C. El ARN se extrajo utilizando el kit de aislamiento de ARN total MagMax mirVana (Thermo Fisher Scientific) en el robot de extracción Kingfisher Flex (Thermo Fisher Scientific). El ARN se transcribió y amplificó inversamente utilizando el kit de 1 paso de ARN a TC de TaqMan (Thermo Fisher). La transcripción inversa se llevó a cabo a 48 °C durante 15 minutos seguido de 2 min a 95 °C. La amplificación se realizó durante 50 ciclos de la siguiente manera: 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. El número de copias de ARN del gen N del SARS-CoV-2 en muestras se determinó mediante un ensayo publicado previamente ([Caso et al., 2020a](#)). Brevemente, un ensayo TaqMan fue diseñado para apuntar a una región altamente conservada del gen N (cebador delantero: ATGCTGCAATCGTGTACAA; Imprimación inversa: m GACTGCCGCCTCTGCTC; Sonda: /56- FAM/TCAAGGAAC/ZEN/AACATTGCCAA/3IABkFQ/). Esta región se incluyó en un estándar de ARN para permitir la determinación del número de copias hasta 10 copias por reacción. La mezcla de reacción contenía concentraciones finales de cebadores o sondas de 500 o 100 nM, respectivamente.

### **Preparación, obtención de imágenes y procesamiento de muestras y rejillas de microscopía electrónica de S6P<sub>ecto</sub>-Complejos fab**

Los Fabs se produjeron mediante la digestión de IgG purificadas por cromatografía recombinante utilizando la enzima proteasa de cisteína inmovilizada con resina (FabALACTICA, Genovis). La digestión se produjo en 100 mM de fosfato de sodio y 150 mM de NaCl pH 7.2 (PBS) durante alrededor de 16 h a temperatura ambiente. Para eliminar el Fc escindido de la IgG intacta, la mezcla de digestión se incubó con resina CaptureSelect Fc (Genovis) durante 30 min a temperatura ambiente en tampón PBS.

Para la detección y la obtención de imágenes del SARS-CoV-2 S6P teñido negativamente<sub>ecto</sub> proteína en complejo con Fabs humanos, las proteínas se incubaron en una proporción molar Fab:S de 4:1 durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Aproximadamente 3 µL de la muestra a concentraciones de aproximadamente 10 a 15 µg / ml se aplicaron a una rejilla descargada con resplandor con película de carbono continua en 400 rejillas de microscopía electrónica de cobre de malla cuadrada (Electron Microscopy Sciences). Las rejillas se tiñeron con formiato de uranilo al 0,75% ([Obi et al., 2004](#)). Las imágenes se grabaron en una cámara GAtan US4000 4k × 4k CCD utilizando un microscopio electrónico de transmisión FEI TF20 (TFS) operado a 200 keV y control con Serial EM. Todas las imágenes se tomaron a 50.000 × aumento con un tamaño de píxel de 2,18 Å por píxel en modo de dosis baja a un desenfoque de 1,5 a 1,8 µm. La dosis total para las micrografías fue de alrededor de 30 e<sup>-</sup> por Å<sup>2</sup>. El procesamiento de imágenes se realizó utilizando el paquete de software cryoSPARC. Se importaron imágenes, se estimó CTF y se recogieron partículas. Las partículas se extrajeron con un tamaño de caja de 256 píxeles y se unieron a 128 píxeles (tamaño de píxel de 4,36 Å / pix) y se realizaron promedios de clase 2D.

### **Mapeo de anticuerpos en epítopos mediante escaneo de alanina**

El mapeo de epítopos se realizó esencialmente como se describió anteriormente ([Davidson y Doranz, 2014](#)) utilizando las bibliotecas de mutaciones de mutagénesis de la proteína S RBD del SARS-CoV-2 (cepa Wuhan-Hu-1) y la mutagénesis de escopeta S2, realizadas utilizando una construcción de expresión de longitud completa para la proteína S. 184 residuos de la RBD (entre los residuos S 335 y 526), y 513 residuos S2 (entre los residuos 689 –1247) fueron mutados individualmente a alanina, y los residuos de alanina a serina. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación del ADN, y los clones se agruparon en una placa de 384 pozos, un mutante por pozo. La unión de mAbs a cada clón mutante en la biblioteca de escaneo de alanina se determinó, por duplicado, mediante citometría de flujo de alto rendimiento. Un plásmido que codifica cDNA para cada mutante de proteína S fue transfecido en células HEK293T y se le permitió expresarse durante 22 h. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (v/v) (Ciencias de la Microscopía Electrónica) y se permeabilizaron con saponina al 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich) en PBS más calcio y magnesio (PBS++) antes de la incubación con mAbs diluidos en PBS++, 10% de suero normal de cabra (Sigma) y saponina al 0,1%. Las concentraciones de detección de mAb se determinaron utilizando una curva de titulación de inmunofluorescencia independiente contra células que expresaban proteína S de tipo salvaje para garantizar que las señales estuvieran dentro del rango lineal de detección. Se detectaron anticuerpos utilizando 3,75 µg/ml de anticuerpos secundarios etiquetados con Alexa Fluor-488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) en suero de cabra normal al 10% con saponina al 0,1%. Las células se lavaron tres veces con PBS ++ / saponina al 0,1% seguida de dos lavados en PBS, y se detectó fluorescencia celular media utilizando un citómetro de flujo Intellicyte iQue de alto rendimiento (Sartorius). La reactividad de anticuerpos contra cada clón mutante de proteína S se calculó en relación con la reactividad de la proteína S de tipo salvaje restando la señal de los controles transfecidos simulados y normalizando a la señal de los controles transfecidos de tipo salvaje S. Las mutaciones dentro de los clones se identificaron como críticas para el epítopo mAb si no apoyaban la reactividad del mAb de prueba, pero apoyaban la reactividad de otros anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Esta estrategia de contra-pantalla facilita la exclusión de mutantes de proteína S que están localmente mal plegados o tienen un defecto de expresión.

## **Unión de la superficie celular a la proteína S de longitud completa, las proteínas varianteS S o la proteína del dominio S2**

Un plásmido que codifica la región S terminal S2 de la proteína S (a partir del residuo S685) fue transfectado en células HEK293T dispuestas en una placa de 384 pozos y se dejó expresar durante 22 h. Las células transfectadas con vector solo actuaron como controles negativos. Los MAbs se examinaron en un rango de concentraciones, 4 réplicas para cada concentración de mAb, como se describe para el mapeo de epítopos. Los valores de fluorescencia se restaron de fondo.

### **Ensayo de unión a ELISA para análisis sérico**

Para evaluar la reactividad sérica, se recubrieron placas de microtitulación de 384 pozos con SARS-CoV-2 S6P recombinante purificado<sub>ecto</sub> a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (2% de leche seca sin grasa y 2% de suero normal de cabra en DPBS que contenía 0,05% tween-20) durante 1 h. El suero se diluyó 1:75 en tampón de bloqueo, y luego se diluyó tres veces en serie 15 veces, y se agregó a los pozos. Se detectó unión con IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante y sustrato de TMB. La reacción se apagó con ácido clorhídrico 1N una vez que se desarrolló el color. La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Biotek).

### **Aislamiento de plasmablastos y análisis citométrico de flujo**

La sangre se recogió en tubos que contenían heparina. Para evaluar la frecuencia de los plasmablastos en pbmc para estudios citométricos de flujo analítico, los PBMC se enriquecieron a partir de sangre total (día 10 después del primero y día 7 después de la segunda vacunación) utilizando el kit de aislamiento directo de PBMC (StemCell Technologies). Para la secreción de anticuerpos de células singe y los estudios de secuenciación de anticuerpos pareados, los plasmablastos se enriquecieron a partir de la sangre entera (día 7 después de la segunda vacunación) mediante la selección negativa utilizando un kit de aislamiento de plasmablastos humanos directos personalizado que contenía perlas paramagnéticas y anticuerpos para la selección negativa (StemCell Technologies). Las células enriquecidas se tiñeron 30 minutos en hielo en un tampón RoboSep (StemCell Technologies) que contenía anticuerpos fenotípicos siguientes; anti-CD19-FITC (dilución 1:20, eBioscience), anti-CD27-APC (dilución 1:20) y anti-CD38-PE (dilución 1:25, BD Biosciences), y luego analizado por citometría de flujo utilizando un clasificador celular SH800 (Sony). Se utilizó una tinción DAPI como colorante de viabilidad para excluir las células muertas. Los plasmablastos fueron identificados como DAPI-CD19<sup>lo</sup>CD27<sup>hola</sup>CD38<sup>hola</sup> células. Aproximadamente 40,000 y ~6,000 plasmablastos fueron clasificados por FACS a granel para la secuenciación de anticuerpos pareados y los estudios de secreción de anticuerpos unicelulares, respectivamente.

### **Generación de bibliotecas de genes variables de anticuerpos a partir de plasmablastos individuales**

Para la secuenciación de anticuerpos pareados, las células se resuspendieron en DPBS que contenía 0,04% de BSA no acetilada, se dividieron en cuatro réplicas y se agregaron por separado a 50 µL de RT Reagent Mix, 5,9 µL de Poly-dt RT Primer, 2,4 µL de Aditivo A y 10 µL de RT Enzyme Mix B para completar la Mezcla de Reacción

según el protocolo del proveedor. Las reacciones se cargaron en un chip de cromo (10x Genomics). Las bibliotecas enriquecidas con células B de células únicas de cromo se generaron, cuantificaron, normalizaron y secuenciaron de acuerdo con la Guía del usuario para kits de reactivos de células individuales de cromo V(D)J (CG000086\_REV C). Los amplicones se secuenciaron en un Illumina Novaseq 6000, y los datos se procesaron utilizando el software CellRanger v3.1.0 (10X Genomics).

### **Análisis de secreción de anticuerpos unicelulares utilizando el instrumento Beacon**

Los plasmablastos purificados por FACS se resuspendieron en un medio de supervivencia de plasmablastos que promueve la secreción de anticuerpos y se evaluó la reactividad de los anticuerpos secretados utilizando el chip 11k en el instrumento optofluídico Beacon (Berkley Lights) como se describió anteriormente ([Zost et al., 2020b](#)). El ensayo de unión a la secreción de anticuerpos unicelulares se realizó como se describió anteriormente ([Zost et al., 2020b](#)) utilizando el SARS-CoV-2 S6P<sub>ecto</sub>- y cuentas recubiertas de SARS-CoV-2 RBD.

### **Ensayo ELISpot**

Se realizó un ensayo directo de punto inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISpot) para enumerar los plasmablastos presentes en las muestras de PBMC que secretan anticuerpos IgG, IgM o IgA que reaccionan con EL SARS-CoV-2-S6P<sub>ecto</sub> proteína o influenza A/Darwin/42/2020 Proteína de hemaglutinina H1N1 (como control negativo). Brevemente, las placas ELISpot MSIP de 96 pozos (Millipore) se activaron con 100 µL 100% metanol/pozo durante 10 s, se lavaron tres veces con 1 × DPBS, se recubrieron durante la noche con 100 µL de 2 µg/ml de SARS-CoV-2-S6P<sub>ecto</sub> o la proteína HA de la influenza en PBS durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con 1 × DPBS y se bloquearon por incubación con RPMI que contenía 10% fcS a 37 °C durante 2 h. Se agregaron plasmablastos enriquecidos o plasmablastos clasificados por FACS a las placas y se incubaron 18-24 h a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS y luego PBS que contenían 0.05% tween, y luego se incubaron con anticuerpos conjugados IgG-HRP anti-humanos de cabra (Southern Biotech), anticuerpos conjugados igA-HRP anti-humanos de cabra (Southern Biotech) o anticuerpos conjugados igM-HRP anti-humanos de cabra (Southern Biotech) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS que contenía 0.05% Tween/1% BSA, las placas se desarrollaron utilizando sustrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) (Sigma). Las placas desarrolladas fueron escaneadas y las manchas fueron analizadas utilizando un contador ELISpot automatizado (Cellular Technologies Ltd.). Se agregaron plasmablastos o plasmablastos clasificados de PBMCs a las placas y se incubaron 18-24 h a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS y luego pbS que contenían 0.05% tween, y luego se incubaron con anticuerpos conjugados IgG-HRP antihumanos de cabra (Southern Biotech, catálogo no. 2040-05), anticuerpos conjugados IgA-HRP antihumanos de cabra (Southern Biotech, catálogo no. 2050-05) o anticuerpos conjugados igM-HRP antihumanos de cabra (Southern Biotech, catálogo no. 2020-05) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS que contenía 0.05% Tween/1% BSA, las placas se desarrollaron utilizando sustrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) (Sigma). Las placas desarrolladas fueron escaneadas y las manchas fueron analizadas utilizando un contador ELISpot automatizado (Cellular Technologies Ltd.).

## Cuantificación y análisis estadístico

La media estadística descriptiva  $\pm$  SEM o la media  $\pm$  SD se determinaron para las variables continuas como se señaló. Los títulos de virus en los tejidos se compararon utilizando ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Tukey. Las curvas para la unión y neutralización de anticuerpos se ajustaron después de la transformación logarítmica de las concentraciones de anticuerpos mediante análisis de regresión no lineal. Las réplicas técnicas y biológicas se indican en las leyendas de las figuras. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism v8.4.3 (GraphPad).

Vete a:

## Reconocimientos

La recolección de datos se recolectó en las instalaciones cryo-EM del Centro de Biología Estructural de la Universidad de Vanderbilt. Agradecemos a Cinque Soto por su asesoramiento técnico en el estudio de clonotipos públicos. Agradecemos a Rachel Nargi, Joseph Reidy, Erica Armstrong y Christopher Gainza por su apoyo en las purificaciones de anticuerpos. También agradecemos a Berkeley Lights y Jonathan Didier por su apoyo técnico experto, y a STEMCELL Technologies y Aida Mayhew por suministrar reactivos cruciales de enriquecimiento de células B. Agradecemos a Jem Uhrula, Brendan Larson y al Dr. Mike Worobey (Universidad de Arizona) por la preparación y secuenciación de las existencias de SARS-CoV-2 de paso temprano. Agradecemos a Eun-Hyung Lee, Doan C. Nguyen e Ignacio Sanz de la Universidad de Emory por compartir el medio de supervivencia de plasmablast que promueve la secreción de anticuerpos. Agradecemos a los donantes anónimos de las muestras de plasma por su consentimiento que permitió preparar la norma internacional de la OMS para la inmunoglobulina humana anti-SARS-CoV-2; expresamos nuestra gratitud a quienes han coordinado la recolección del plasma convaleciente: Malcom Semple (Universidad de Liverpool, Reino Unido), Lance Turtle (Universidad de Liverpool, Reino Unido), Peter Openshaw (Imperial College London, Reino Unido) y Kenneth Baillie (Universidad de Edimburgo) en nombre de los investigadores de ISARIC4C; y Heli Harvala Simmonds y David Roberts (National Health Service Blood and Transplant, Reino Unido). También agradecemos al personal de Producción y Desarrollo de Estándares de NIBSC por la formulación y distribución de materiales. Agradecemos a Chris Selverian por su ayuda en el mapeo de epítopos y a Mallorie Fouch por los estudios de unión de S2. Este trabajo fue apoyado por las subvenciones HR0011-18-2-0001 y HR0011-3-0001 de la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzada de Defensa (DARPA); Contratos de los NIH de EE. UU. 75N93019C00074, 75N93019C00062 y 75N93019C00073 (a B.J.D.); NIH otorga AI150739, AI130591, R35 HL145242, AI157155, AI141707, AI12893, AI083203, AI149928, AI095202, AI083203, GM136853, DK103126 y UL1 TR001439; el Fondo de Investigación Dolly Parton COVID-19 en Vanderbilt; RII COVID-19 Seed Grant 002196 de la Universidad de Arizona; una subvención de Fast Grants, Mercatus Center, George Mason University; y financiación de AstraZeneca. E.C.C. fue apoyado por la subvención de los NIH T32 AI138932, y E.S.W. fue apoyado por la subvención F30 AI152327 de los NIH. J.E.C. recibió el Premio Future Insight 2019 de Merck KGaA, que apoyó este trabajo con una subvención.

## Contribuciones de los autores

Conceptualización, E.C.C. y J.E.C.; investigación, E.C.C., P.G., S.J.Z., N.S., M.S.D., E.S.W., C.R.C., C.A.T., S.L., S.K.C., E.B., J.K.W., S.D., L.M., A.T., J.R., R.E.S., E.D. y R.E.C.; redacción del primer borrador: E.C.C. y J.E.C.; todos los autores editaron el manuscrito y aprobaron la presentación final; supervisión, B.J.D., R.H.C., C.A.T., M.S.D. y J.E.C.; adquisición de fondos, M.S.D. y J.E.C.

### Declaración de intereses

E.D., J.K.W. y B.J.D. son empleados de Integral Molecular, y B.J.D. es accionista de esa compañía. M.S.D. es consultor de Inbios, Vir Biotechnology, NGM Biopharmaceuticals y Carnival Corporation y forma parte de los Consejos Asesores Científicos de Moderna e Immunome. El laboratorio Diamond ha recibido apoyo financiero en acuerdos de investigación patrocinados por Moderna, Vir Biotechnology y Emergent BioSolutions. J.E.C. se ha desempeñado como consultor de Luna Biologics, es miembro del Consejo Asesor Científico de Meissa Vaccines y es fundador de IDBiologics. El laboratorio Crowe ha recibido apoyo financiero en acuerdos de investigación patrocinados por AstraZeneca, IDBiologics y Takeda.

[Vete a:](#)

### Notas

Publicado: agosto 10, 2021

[Vete a:](#)

### Notas

La información complementaria se puede encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109604>.

[Vete a:](#)

### Información complementaria

#### Documento S1. Figuras S1–S8:

[Haga clic aquí para ver.](#) (3.4M, pdf)

#### Documento S2. Artículo más información complementaria:

[Haga clic aquí para ver.](#) (9.2M, pdf)

[Vete a:](#)

### Disponibilidad de datos y código

La deposición del archivo de lectura de secuencia para los clonotipos públicos identificados se deposita en el NCBI: PRJNA511481. La deposición para las secuencias pareadas de plasmablastos de cadena pesada y ligera, que se identificaron como clonotipos públicos, después de la vacunación con ARNm se deposita en GenBank con números de acceso [MZ555491](#) a través de [MZ555628](#). Las secuencias de COV2-2164 se depositan en GenBank con números de acceso [MZ555629](#) y [MZ555630](#). Todos los demás datos están disponibles en el texto principal o en los materiales complementarios. La canalización computacional para el análisis de agrupación en clústeres, el script para crear mapas de calor y el script PyIR utilizado para determinar las características de

secuencia de cada anticuerpo están disponibles como se indica en la [tabla Recursos clave](#). Cualquier información adicional requerida para volver a análisis de los datos reportados en este documento está disponible en el contacto principal a pedido.

[Vete a:](#)

## Referencias

1. Anderson E.M., Goodwin E.C., Verma A., Arevalo C.P., Bolton M.J., Weirick M.E., Gouma S., McAllister C.M., Christensen S.R., Weaver J., UPenn COVID Processing Unit Los anticuerpos estacionales contra el coronavirus humano se potencian con la infección por SARS-CoV-2, pero no se asocian con la protección. *Celda*. 2021; 184:1858–1864.e10. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
2. Bailey J.R., Flyak A.I., Cohen V.J., Li H., Wasilewski L.N., Snider A.E., Wang S., Learn G.H., Kose N., Loerinc L. Anticuerpos ampliamente neutralizantes con pocas mutaciones somáticas y eliminación del virus de la hepatitis C. *Perspectiva de la JCI*. 2017; 2:92872. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
3. Bepler T., Kelley K., Noble A.J., Berger B. Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM and cryoET. *Nat. Commun.* 2020; 11:5208. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
4. Bepler T., Morin A., Rapp M., Brasch J., Shapiro L., Noble A.J., Berger B. Redes neuronales convolucionales positivas sin etiquetar para la selección de partículas en micrografías crioeconómicas. *Nat. Métodos*. 2019; 16:1153–1160. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
5. Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A., Rottier P.J. La proteína espiga del coronavirus es una proteína de fusión de virus de clase I: caracterización estructural y funcional del complejo del núcleo de fusión. *J. Virol.* 2003; 77:8801–8811. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
6. Briney B., Inderbitzin A., Joyce C., Burton D.R. Commonality a pesar de la diversidad excepcional en el repertorio de anticuerpos humanos de referencia. *Naturaleza*. 2019; 566:393–397. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
7. 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. Potentes anticuerpos neutralizantes de pacientes con COVID-19 definen múltiples objetivos de vulnerabilidad. *Ciencia*. 2020; 369:643–650. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
8. Cao Y., Su B., Guo X., Sun W., Deng Y., Bao L., Zhu Q., Zhang X., Zheng Y., Geng C. Potentes anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 identificados por secuenciación unícelular de alto rendimiento de células B de pacientes convalecientes. *Celda*. 2020; 182:73–84.e16. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
9. Caso J.B., Bailey A.L., Kim A.S., Chen R.E., Diamond M.S. Crecimiento, detección, cuantificación e inactivación del SARS-CoV-2. *Virología*. 2020; 548:39–48. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
10. Caso J.B., Rothlauf P.W., Chen R.E., Liu Z., Zhao H., Kim A.S., Bloyet L.M., Zeng Q., Tahan S., Droit L. Anticuerpo neutralizante e inhibición soluble de ACE2 de un VSV-SARS-CoV-2 competente para la replicación y un aislado

- clínico de SARS-CoV-2. *Microbio huésped celular*. 2020; 28:475–485.e5. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
11. Chen R.E., Zhang X., Case J.B., Winkler E.S., Liu Y., VanBlargan L.A., Liu J., Errico J.M., Xie X., Suryadevara N. Resistencia de las variantes del SARS-CoV-2 a la neutralización por anticuerpos policlonales monoclonales y derivados del suero. *Nat. Med.* 2021; 27:717–726. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  12. Chng J., Wang T., Nian R., Lau A., Hoi K.M., Ho S.C., Gagnon P., Bi X., Yang Y. Escindir péptidos 2A eficientes para la expresión de anticuerpos monoclonales de alto nivel en células CHO. *MAbs*. 2015; 7:403–412. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  13. Cohen-Dvashi H., Zehner M., Ehrhardt S., Katz M., Elad N., Klein F., Diskin R. Base estructural para una respuesta inmune convergente contra el virus del Ébola. *Microbio huésped celular*. 2020; 27:418–427.e4. [PubMed] [Google Scholar]
  14. Collier D.A., De Marco A., Ferreira I.A.T.M., Meng B., Datir R.P., Walls A.C., Kemp S.A., Bassi J., Pinto D., Silacci-Fregni C. Sensibilidad del SARS-CoV-2 B.1.1.7 a los anticuerpos provocados por la vacuna de ARNm. *Naturaleza*. 2021; 593:136–141. [PubMed] [Google Scholar]
  15. Davidson E., Doranz B.J. Un enfoque de mutagénesis de escopeta de alto rendimiento para mapear epítopos de anticuerpos de células B. *Immunología*. 2014; 143:13–20. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  16. Davis C.W., Jackson K.J.L., McElroy A.K., Halfmann P., Huang J., Chennareddy C., Piper A.E., Leung Y., Albarino C.G., Crozier I. Análisis longitudinal de la respuesta de las células B humanas a la infección por el virus del Ébola. *Celda*. 2019; 177:1566–1582.e17. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  17. Dingens A.S., Crawford K.H.D., Adler A., Steele S.L., Lacombe K., Eguia R., Amanat F., Walls A.C., Wolf C.R., Murphy M. Identificación serológica de infecciones por SARS-CoV-2 entre niños que visitan un hospital durante el brote inicial de Seattle. *Nat Commun.* 2020; 11:4378. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  18. Dong J., Zost S.J., Greaney A.J., Starr T.N., Dingens A.S., Chen E.C., Chen R.E., Case J.B., Sutton R.E., Gilchuk P. Bases genéticas y estructurales para el reconocimiento de la proteína espiga del SARS-CoV-2 mediante un cóctel de dos anticuerpos. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.27.428529. [CrossRef] [Google Scholar]
  19. Ehrhardt S.A., Zehner M., Krähling V., Cohen-Dvashi H., Kreer C., Elad N., Gruell H., Ercanoglu M.S., Schommers P., Gieselmann L. Respuesta de anticuerpos policlonales y convergentes a la vacuna contra el virus del Ébola rVSV-ZEBOV. *Nat. Med.* 2019; 25:1589–1600. [PubMed] [Google Scholar]
  20. Giang E., Dorner M., Prentoe J.C., Dreux M., Evans M.J., Bukh J., Rice C.M., Ploss A., Burton D.R., Law M. Anticuerpos humanos ampliamente neutralizantes contra el complejo glicoproteico de la envoltura del virus de la hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:6205–6210. [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar]
  21. Gilchuk P., Bombardi R.G., Erasmus J.H., Tan Q., Nargi R., Soto C., Abbink P., Suscovich T.J., Durnell L.A., Khandhar A. Pipeline integrado para el

- descubrimiento acelerado de terapias de anticuerpos antivirales. *Nat. Biomed. Ós.* 2020; 4:1030–1043. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Golden J.W., Cline C.R., Zeng X., Garrison A.R., Carey B.D., Mucker E.M., White L.E., Shamblin J.D., Brocato R.L., Liu J. Los ratones transgénicos 2 humanos convertidores de angiotensina infectados con SARS-CoV-2 desarrollan una enfermedad respiratoria grave y mortal. *Perspectiva de la JCI.* 2020; 5:142032. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Greaney A.J., Starr T.N., Gilchuk P., Zost S.J., Binshtain E., Loes A.N., Hilton S.K., Huddleston J., Eguia R., Crawford K.H.D. Mapeo completo de mutaciones al dominio de unión al receptor de picos del SARS-CoV-2 que escapan al reconocimiento de anticuerpos. *Microbio huésped celular.* 2021; 29:44–57.e9. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K. Los estudios en ratones humanizados y humanos convalecientes producen un cóctel de anticuerpos contra el SARS-CoV-2. *Ciencia.* 2020; 369:1010–1014. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A. La entrada de células del SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de la proteasa clínicamente probado. *Celda.* 2020; 181:271–280.e8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Jiang S., Hillyer C., Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol.* 2020;41:355–359. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Joyce M.G., Wheatley A.K., Thomas P.V., Chuang G.Y., Soto C., Bailer R.T., Druz A., Georgiev I.S., Gillespie R.A., Kanekiyo M., NISC Comparative Sequencing Program Vaccine-induced antibodies that neutralize Group 1 and Group 2 influenza A viruses. *Cell.* 2016;166:609–623. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.* 2020;586:516–527. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Kreer C., Zehner M., Weber T., Ercanoglu M.S., Gieselmann L., Rohde C., Halwe S., Korenkov M., Schommers P., Vanshylla K. Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell.* 2020;182:843–854.e12. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Ladner J.T., Henson S.N., Boyle A.S., Engelbrektson A.L., Fink Z.W., Rahee F., D'ambrozio J., Schaecher K.E., Stone M., Dong W. Epitope-resolved profiling of the SARS-CoV-2 antibody response identifies cross-reactivity with endemic human coronaviruses. *Cell Rep. Med.* 2021;2:100189. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426:450–454. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueiroa A. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.* 2020;584:450–456. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

33. Mukhamedova M., Wrapp D., Shen C.H., Gilman M.S.A., Ruckwardt T.J., Schramm C.A., Ault L., Chang L., Derrien-Colemy A., Lucas S.A.M. Vaccination with prefusion-stabilized respiratory syncytial virus fusion protein induces genetically and antigenically diverse antibody responses. *Immunity*. 2021;54:769–780.e6. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
34. Mukherjee S., Sirohi D., Dowd K.A., Chen Z., Diamond M.S., Kuhn R.J., Pierson T.C. Enhancing dengue virus maturation using a stable furin over-expressing cell line. *Virology*. 2016;497:33–40. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
35. Nielsen S.C.A., Yang F., Hoh R.A., Jackson K.J.L., Roeltgen K., Lee J.Y., Rustagi A., Rogers A.J., Powell A.E., Kim P.S. B cell clonal expansion and convergent antibody responses to SARS-CoV-2. *Res Sq.* 2020 doi: 10.21203/rs.3.rs-27220/v1. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
36. Ohi M., Li Y., Cheng Y., Walz T. Negative staining and image classification – Powerful tools in modern electron microscopy. *Biol. Proced. Online*. 2004;6:23–34. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
37. Pappas L., Foglierini M., Piccoli L., Kallewaard N.L., Turrini F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B., Agatic G., Giacchettino-Sasselli I., Pellicciotta G. Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature*. 2014;516:418–422. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
38. 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. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
39. Plante J.A., Liu Y., Liu J., Xia H., Johnson B.A., Lokugamage K.G., Zhang X., Muruato A.E., Zou J., Fontes-Garfias C.R. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*. 2021;592:116–121. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
40. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. cryo- SPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*. 2017;14:290–296. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
41. Rapp M., Guo Y., Reddum E.R., Liu L., Wang P., Yu J., Cerutti G., Bimela J., Bahna F., Manneppalli S. Modular basis for potent SARS-CoV-2 neutralization by a prevalent VH1-2-derived antibody class. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.11.426218. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
42. Rennick L.J., Robinson-McCarthy L.R., Nambulli S., Duprex W.P., McCarthy K.R. Deletion disrupts a conserved antibody epitope in a SARS-CoV-2 variant of concern. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.03.05.434168. [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
43. 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 infection in convalescent individuals. *bioRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.05.13.092619. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
44. 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](#)]
45. Setliff I., McDonnell W.J., Raju N., Bombardi R.G., Murji A.A., Scheepers C., Ziki R., Mynhardt C., Shepherd B.E., Mamchak A.A. Multi-donor longitudinal antibody repertoire sequencing reveals the existence of public antibody clonotypes in HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*. 2018;23:845–854.e6. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Seydoux E., Homad L.J., MacCamay A.J., Parks K.R., Hurlburt N.K., Jennewein M.F., Akins N.R., Stuart A.B., Wan Y.H., Feng J. Characterization of neutralizing antibodies from a SARS-CoV-2 infected individual. *bioRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.05.12.091298. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Smith S.A., Zhou Y., Olivarez N.P., Broadwater A.H., de Silva A.M., Crowe J.E., Jr. Persistence of circulating B memory cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. *J. Virol.* 2012;86:2665–2675. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Soto C., Bombardi R.G., Branchizio A., Kose N., Matta P., Sevy A.M., Sinkovits R.S., Gilchuk P., Finn J.A., Crowe J.E., Jr. High frequency of shared clonotypes in human B cell receptor repertoires. *Nature*. 2019;566:398–402. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Soto C., Finn J.A., Willis J.R., Day S.B., Sinkovits R.S., Jones T., Schmitz S., Meiler J., Branchizio A., Crowe J.E., Jr. PyIR: a scalable wrapper for processing billions of immunoglobulin and T cell receptor sequences using IgBLAST. *BMC Bioinformatics*. 2020;21:314. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16:265–273. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Suryadevara N., Shrihari S., Gilchuk P., VanBlargan L.A., Binshtain E., Zost S.J., Nargi R.S., Sutton R.E., Winkler E.S., Chen E.C. Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.19.427324. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Tan T.J.C., Yuan M., Kuzelka K., Padron G.C., Beal J.R., Chen X., Wang Y., Rivera-Cardona J., Zhu X., Stadtmauer B.M. Sequence signatures of two IGHV3-53/3-66 public clonotypes to SARS-CoV-2 receptor binding domain. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.26.428356. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Tortorici M.A., Veesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus Res.* 2019;105:93–116. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
54. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E.J., Msomi N. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *medRxiv*. 2020;(Published online December 22, 2020) doi: 10.1101/2020.12.21.20248640. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Tortorici M.A., Beltramello M., Lempp F.A., Pinto D., Dang H.V., Rosen L.E., McCallum M., Bowen J., Minola A., Jaconi S. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple

- mechanisms. *Science*. 2020;370:950–957. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
56. Voss W.N., Hou Y.J., Johnson N.V., Kim J.E., Delidakis G., Horton A.P., Bartzoka F., Paresi C.J., Tanno Y., Abbasi S.A. Prevalent, protective, and convergent IgG recognition of SARS-CoV-2 non-RBD spike epitopes in COVID-19 convalescent plasma. *bioRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.12.20.423708. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020;94:e00127-20. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
58. Wang P., Nair M.S., Liu L., Iketani S., Luo Y., Guo Y., Wang M., Yu J., Zhang B., Kwong P.D. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*. 2021;593:130–135. [PubMed] [Google Scholar]
59. Wang Z., Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Barnes C.O., Finkin S., Schaefer-Babajew D., Cipolla M., Gaebler C., Lieberman J.A. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*. 2021;592:616–622. [PubMed] [Google Scholar]
60. 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]
61. Wheatley A.K., Whittle J.R., Lingwood D., Kanekiyo M., Yassine H.M., Ma S.S., Narpal S.R., Prabhakaran M.S., Matus-Nicodemos R.A., Bailer R.T. H5N1 vaccine-elicited memory B cells are genetically constrained by the IGHV locus in the recognition of a neutralizing epitope in the hemagglutinin stem. *J. Immunol.* 2015;195:602–610. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
62. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B.E., de Oliveira T., Vermeulen M., van der Berg K. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.18.427166. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
63. Williams W.B., Liao H.X., Moody M.A., Kepler T.B., Alam S.M., Gao F., Wiehe K., Trama A.M., Jones K., Zhang R. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science*. 2015;349:aab1253. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
64. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., Nair S., McCune B.T., Yu J., Fox J.M., Chen R.E., Earnest J.T., Keeler S.P. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* 2020;21:1327–1335. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
65. Wu X., Zhou T., Zhu J., Zhang B., Georgiev I., Wang C., Chen X., Longo N.S., Louder M., McKee K., NISC Comparative Sequencing Program Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science*. 2011;333:1593–1602. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
66. Wu N.C., Yuan M., Bangaru S., Huang D., Zhu X., Lee C.D., Turner H.L., Peng L., Yang L., Burton D.R. A natural mutation between SARS-CoV-2 and SARS-

- CoV determines neutralization by a cross-reactive antibody. *PLoS Pathog.* 2020;16:e1009089. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
67. Yuan M., Liu H., Wu N.C., Lee C.D., Zhu X., Zhao F., Huang D., Yu W., Hua Y., Tien H. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369:1119–1123. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
68. Yuan M., Wu N.C., Zhu X., Lee C.D., So R.T.Y., Lv H., Mok C.K.P., Wilson I.A. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*. 2020;368:630–633. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
69. Yuan M., Huang D., Lee C.C.D., Wu N.C., Jackson A.M., Zhu X., Liu H., Peng L., van Gils M.J., Sanders R.W. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.02.16.430500. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
70. Zang R., Gomez Castro M.F., McCune B.T., Zeng Q., Rothlauf P.W., Sonnek N.M., Liu Z., Brulois K.F., Wang X., Greenberg H.B. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci. Immunol.* 2020;5:eabc3582. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
71. Zheng J., Wong L.R., Li K., Verma A.K., Ortiz M.E., Wohlford-Lenane C., Leidinger M.R., Knudson C.M., Meyerholz D.K., McCray P.B., Jr., Perlman S. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature*. 2021;589:603–607. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
72. 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., NISC Comparative Sequencing Program Structural repertoire of HIV-1-neutralizing antibodies targeting the CD4 supersite in 14 donors. *Cell*. 2015;161:1280–1292. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
73. Zost S.J., Gilchuk P., Case J.B., Binshtain 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. [\[Artículo gratuito de PMC\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
74. 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. [\[Artículo gratuito de PMC\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
75. Zost S.J., Dong J., Gilchuk I.M., Gilchuk P., Thornburg N.J., Bangaru S., Kose N., Finn J.A., Bombardi R., Soto C. Características canónicas de los anticuerpos humanos que reconocen la interfaz del trímero de hemaglutinina de la influenza. *J. Clin. Invertir.* 2021; 131:e146791. [\[Artículo gratuito de PMC\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)