

EFFECTO DEL MÉTODO DE PRODUCCIÓN EN LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA RBD DE CORONAVIRUS DE VARIANTES DE PREOCUPACIÓN: IMPLICACIONES EN LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS SEROLÓGICOS

Michelle Gutiérrez, Daniel Barreto, Violeta Guadarrama, Vanesa Hernández, Alberto Porras, Laura Palomares y Octavio T. Ramírez. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología UNAM, México Av. Universidad No. 2001, Cuernavaca, Mor. México C.P. 62210. michelle.gutierrez@ibt.unam.mx

Palabras clave: RBD, ensayo serológico, SARS-CoV-2

Introducción. La alta circulación y replicación del SARS-CoV-2 en la población humana ha generado variantes de preocupación. Para determinar la magnitud de la respuesta inmune generada frente a las diferentes variantes del coronavirus, es necesario desarrollar ensayos serológicos específicos y sensibles. En este estudio, determinamos si la especificidad y la sensibilidad de estos ensayos se ven afectados por varios factores, entre ellos las mutaciones en la secuencia del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína spike del SARS-CoV-2 de la variante original (Wuhan) y las variantes Alfa y Delta. El efecto de las características de cada RBD sobre la determinación de IgG en muestras de suero de personas vacunadas o previamente infectadas por SARS-CoV-2 fueron determinadas.

Metodología. Se generaron líneas celulares que expresan de manera estable las distintas variantes de la proteína RBD. Células CHO, transfectadas con el plásmido pMONO que codifica para cada variante, fueron seleccionadas con 10µg/mL de blasticidina. Las diferentes líneas celulares fueron crecidas en medio de cultivo CellVento (Merck) y en lote alimentado. Los cultivos fueron escalados desde matraces de 200mL hasta biorreactores de tanque agitado de 5, 10 y 50L, manteniendo condiciones de 5% CO₂, 30% OD, 37°C y pH 7.2. Los sobrenadantes cosechados fueron concentrados y dializados por filtración de flujo tangencial (TFF) y purificados por afinidad en una resina IMAC (Fractogel Chelate Merck). La proteína purificada fue diafiltrada por TFF en PBS 1X y analizada para determinar pureza por SDS-PAGE, concentración por Bradford, potencia por ELISA y N-glicosilación por HILIC. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con las variantes de RBD en un ensayo adaptado y validado de un protocolo aprobado por agencias reguladoras internacionales (1).

Resultados. El perfil de glicosilación de la RBD Alfa cambió con la escala. Se observan diferencias en el contenido de manosa y ácido siálico entre las variantes, pero no afecta el reconocimiento por ELISA.

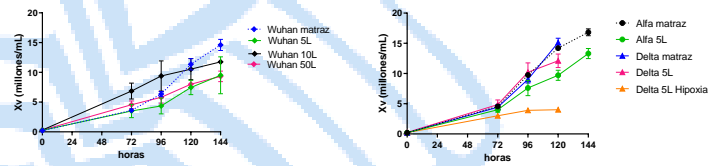


Fig. 1. Cinéticas de cultivo de las diferentes líneas CHO-RBD



Fig. 2. Tren de purificación para las proteínas RBD

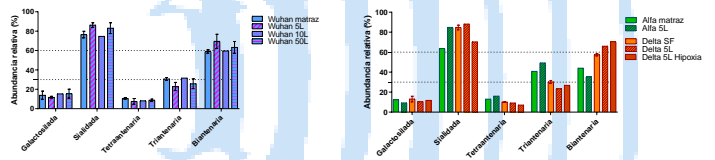


Fig. 3. Perfil de N-glicosilación de las proteínas RBD producidas

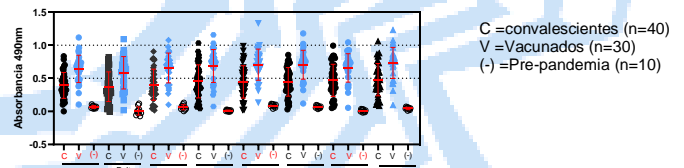


Fig. 4. ELISA indirecto utilizando las variantes de RBD como antígeno y suero de personas

Conclusiones. Resultados preliminares en la determinación de IgG no muestran diferencia entre variantes de RBD.

Agradecimientos. J.C. Rivera, A. Gómez, J. C. Arizmendi, L.G. de la Fuente, R. González, M. Contreras. Dr. J. Martínez-Barnette (INSP) por los sueros donados. Proyectos DGAPA: IV200820, IV200420 e IT200521.

Bibliografía.

1. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, et al. (2020) Nat Med. 26(7):1033-6.