

Vacunas anti COVID-19 basadas en la glicoproteína Spike del SARS-CoV-2 producida de forma recombinante: Situación actual y tecnologías de producción

Vanessa Hernández¹ y José A. Serrato^{2*}

¹*Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos.*

²*Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Alcaldía de Tlalpan, C.P 14080, CDMX.*

serratoiner@gmail.com

Resumen

La pandemia de COVID-19 que actualmente vivimos ha dejado de manifiesto la importancia de la biotecnología para la salud pública. En tiempo récord se generaron cientos de candidatos de vacunas; desde los desarrollos biotecnológicos más novedosos basados en ARN, vectores virales y proteínas recombinantes, hasta las de tecnologías tradicionales de virus atenuados e inactivados. En diciembre de 2021 la OMS aprobó para su uso de emergencia la primera vacuna basada en proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2. Este tipo de vacunas representan el mayor número de candidatos en ensayos clínicos de Fase III, algunas en espera de su aprobación y otras ya aprobadas para uso de emergencia en su país de origen y en algunos países en desarrollo con urgencia de vacunar a su población. Interesantemente, para su producción, se han utilizado indistintamente todos los sistemas de expresión recombinante disponibles: levaduras, bacterias, plantas y células animales (mamífero e insecto), siendo este último el más utilizado. Dichas vacunas representan una excelente alternativa para coadyuvar en el proceso de vacunación debido a su seguridad, capacidad de producción, facilidad de manejo y bajo costo. En la presente revisión se analiza la situación actual de las vacunas anti COVID-19 basados en la proteína *Spike* (S) o su dominio de unión al receptor (RBD) del virus SARS-CoV-2 así como los sistemas de expresión recombinante más utilizados para su producción.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, vacunas, Spike, RBD, proteínas recombinantes.

Abstract

The COVID-19 pandemic we are currently experiencing has highlighted the importance of biotechnology for public health. Hundreds of vaccine candidates have been developed in record time, from the most innovative biotechnological developments based on RNA, viral vectors and recombinant proteins, to the more traditional ones based on technologies of attenuated and inactivated viruses. In December 2021 the WHO approved for emergency use the first vaccine based on recombinant viral proteins of SARS-CoV-2. These kind of vaccines represent the most significant number of candidates in Phase III clinical trials, some awaiting approval and others already approved for emergency use in their country of origin and in some developing countries with urgency to vaccinate their population. Interestingly, all the recombinant expression systems available were indistinctly used in developing these vaccines: animal cells (mammalian and insect), yeast, bacteria,

and plants. These vaccines represent an excellent alternative to assist in the vaccination process due to their safety, production capacity, easy of handle, and low cost. This review analyzes the current situation of vaccines against COVID-19 based on the *Spike* protein (S) or its receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 virus, and the recombinant expression systems most used for their development.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, vaccines, spike, RBD, recombinant proteins.

(<https://coronavirus.jhu.edu/region/mexico>). A un año del inicio de de la campaña de

Introducción

2020 será recordado por la propagación pandémica del nuevo Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2, del inglés “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”) responsable de la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19, del inglés “Coronavirus Disease 2019”). El SARS-CoV-2 es un virus altamente transmisible y patogénico causante de la COVID-19, con un rango de manifestaciones que pueden ir desde un resfriado común hasta neumonía severa y otras manifestaciones graves que pueden causar la muerte (Hoffmann & Kamps, 2021). Desde inicios del 2021 se contó con diferentes vacunas aprobadas por la OMS para su uso de emergencia, fundamentalmente vacunas de ARN, de vectores virales y de virus inactivados (Venkadapathi et al., 2021). Sin embargo, contrario a las expectativas generadas por la disponibilidad de vacunas dicho año no fue menos complejo, particularmente en países en desarrollo y de bajos ingresos; la baja disponibilidad de vacunas en conjunto a los requerimientos particulares para su manejo y aplicación hicieron el proceso de vacunación muy lento (Cioffi and Cioffi, 2021; Rahman and Islam, 2021), favoreciendo la aparición y diseminación de nuevas variantes del virus (Harvey et al., 2021), extendiendo la duración de la pandemia y acentuando sus consecuencias a todos los niveles; salud, educativo, económico y social por solo mencionar algunos sectores (Nicola et al., 2020). Al 01 de abril de 2022 se han infectado 489 millones de personas a nivel global, de los cuales 6.15 millones perdieron la vida (<https://coronavirus.jhu.edu/>). En México, 5.66 millones de personas se han infectado, de los cuales 323,000 (5.7%) no sobrevivieron a la enfermedad

vacunación solo se ha conseguido vacunar con al menos una dosis al 66% de la población mundial(<https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>) y para el caso de nuestro país con esquema completo al 62.5% (<https://coronavirus.jhu.edu/region/mexico>). Las vacunas basadas en las proteínas S o su dominio RBD del virus SARS-CoV-2, producidas de forma recombinante, como es el caso de la vacuna Nuvaxovid de la farmacéutica estadounidense Novavax, recientemente aprobada por la OMS para su uso de emergencia (<https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccine-2020-11-16>), representan una tecnología exitosa para sumarse al proceso de vacunación, particularmente en países en desarrollo y de bajos recursos económicos.

La proteína S del virus SARS-CoV-2 como antígeno para la producción de vacunas

Estructura del SARS-CoV-2

De acuerdo a su caracterización genética y serológica la familia de los coronavirus se divide en cuatro géneros y generalmente infectan diferentes grupos de animales: *Alfacoronavirus* (*alfa-CoV*), *Betacoronavirus* (*beta-CoV*), *Gamacoronavirus* (*gama-CoV*) y *Deltacoronavirus* (*delta-CoV*). Los *alfa-CoV* y *beta-CoV* se encuentran mayoritariamente en mamíferos en tanto que los *gama-CoV* y *delta-CoV* se encuentran fundamentalmente en aves (Forni et al., 2017). Los coronavirus causantes de las epidemias recientes de SARS (del inglés “Severe Acute Respiratory Syndrome”) en 2003 (por SARS-CoV), de

MERS (del inglés “Middle East Respiratory Syndrome”) en 2012 (por MERS-CoV) y la presente pandemia de COVID-19 (por SARS-CoV-2) corresponden a un subgrupo de *beta*-CoV denominado *Sarbecovirus* (Singh and Yi, 2021).

La secuencia del genoma del SARS-CoV-2 fue elucidada en enero de 2020 (Lu et al., 2020). Mediante análisis filogenético y de genómica comparativa se determinó que el genoma de SARS-CoV-2 tiene tan solo un 50% de homología con el genoma de MERS-CoV. Notablemente SARS-CoV-2 tiene menos de un 80% de identidad con el genoma de SARS-CoV, sin embargo, es importante mencionar que tienen un 94.4% de homología en la secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto que codifica para proteínas no estructurales de sendos virus. Interesantemente SARS-CoV-2 tiene un 96.2% de identidad con el genoma del coronavirus de murciélago (BatCoV) RaTG13 (Abdelrahman et al 2020; Pillay, 2020). A la fecha, se desconoce aún el reservorio animal del cual el SARS-CoV-2 se transmitió al humano (Temmam et al., 2022)

SARS-CoV-2 es un virus morfológicamente esférico y considerado como un virus grande con un diámetro de entre 80 y 120 nm. Es un virus de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo no segmentado. Su genoma está formado por 29903 nucleótidos (~30 kb), lo que lo ubica entre los virus de ARN con genomas más grandes (Hoffmann and Kamps, 2021). La nucleocápside viral está compuesta fundamentalmente por la proteína N (del inglés “Nucleocapsid”) cuya función es estabilizar al ARN viral. Es un virus envuelto en una bicapa lipídica. Dicha cápside viral está compuesta mayoritariamente por la proteína M (del inglés “Membrane”) que da soporte estructural a la cápside. También se encuentra presente la proteína E (del inglés “Envelope”), una pequeña proteína de membrana esencial para el ensamblaje y liberación de los viriones. Finalmente, en la cápside también se encuentra la proteína S (del inglés “Spike”) cuya función es la unión a la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ACE-2, del inglés “Angiotensin Converting Enzyme 2”) presente en la membrana celular de diferentes linajes celulares humanos (Zhao

et al., 2020). La función de la proteína S es fusionarse con la membrana celular y permitir la internalización del virus en la célula (Perlman & McIntosh, 2019; Wrapp et al., 2020). El nombre de coronavirus deriva del latín “corona” en referencia a la corona o halo que se observa en la morfología de los virus del género Coronavirus bajo el microscopio electrónico y que se debe a los trímeros de la proteína S que emergen de la cápside en forma de espículas con una longitud de entre 20 y 40 nm (Zuckerman, 2009).

Proteína S y su dominio RBD

La proteína S (monomérica) está compuesta por 1273 aminoácidos con un peso molecular de 180 kDa aproximadamente; consta de un dominio N-terminal extraviral grande (ectodominio), un dominio transmembranal anclado a la cápside viral y un dominio C-terminal intraviral corto (endodominio) (Figura 1) (Shang et al., 2020; Walls et al., 2020).

En la mayoría de los coronavirus el ectodominio es cortado por proteasas celulares de membrana dividiéndolo en dos subunidades funcionales denominadas S1 y S2. La subunidad S1 corresponde a la parte globular de la espícula responsable de la unión con el receptor ACE2 en tanto que la subunidad S2 corresponde a una subunidad tipo tallo cuya función es facilitar la fusión con la membrana celular (Lan et al., 2020). La subunidad S1 se divide a su vez en un Dominio N-terminal (NTD, del inglés “N-Terminal Domain”) y un Dominio C-terminal (CTD, del inglés “C-Terminal Domain”). El Dominio de Unión al Receptor (RBD, del inglés “Receptor Binding Domain”) se sitúa en el CTD de la subunidad S1. El RBD está compuesto de aproximadamente 200 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 27 kDa. Dentro de la secuencia del RBD se encuentra el Motivo de Unión al Receptor (RBM, del inglés “Receptor Binding Motif”) el cual es el encargado de hacer el primer contacto con el dominio peptidasa del receptor ACE2 (Li et al., 2005). La proteína S es una glicoproteína altamente N-glicosilada; cuenta con 22 sitios de N-glicosilación, de los cuales dos se encuentran en el RBD (en la Asn331 y Asn343) (Watanabe et al 2020; Zhang et al 2021) (Figura 2).

Dada la función primordial de la proteína S y su dominio RBD en el proceso de infección viral, son las proteínas más interesantes para la generación de vacunas, también como antígenos para la producción de anticuerpos monoclonales y para el desarrollo de kits de diagnóstico (Huang et al.,2020; Pillay, 2020).

Vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas S y RBD

El RBD de la proteína S del virus SARS-CoV-2 es un blanco inmunodominante y altamente específico de los anticuerpos producidos en

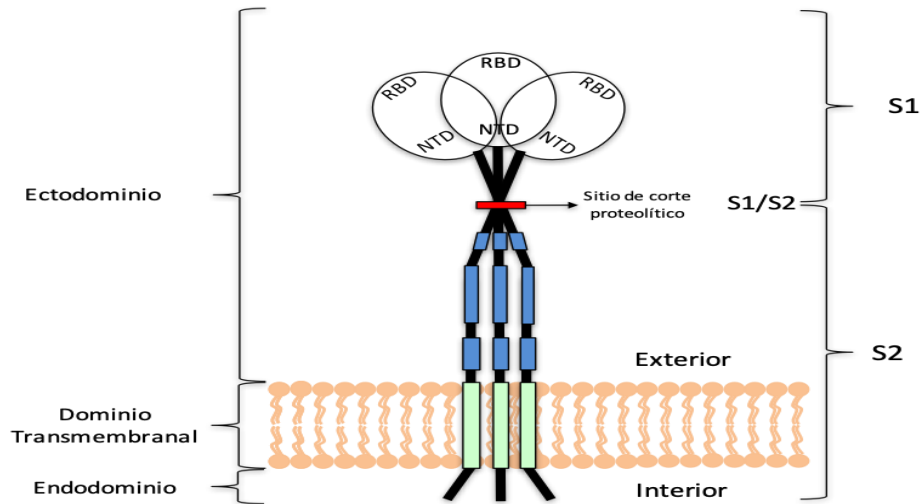


Figura 1. Representación esquemática de la proteína S trimérica del virus SARS-CoV-2. NTD, Dominio N-terminal; RBD, Dominio de Unión al Receptor.

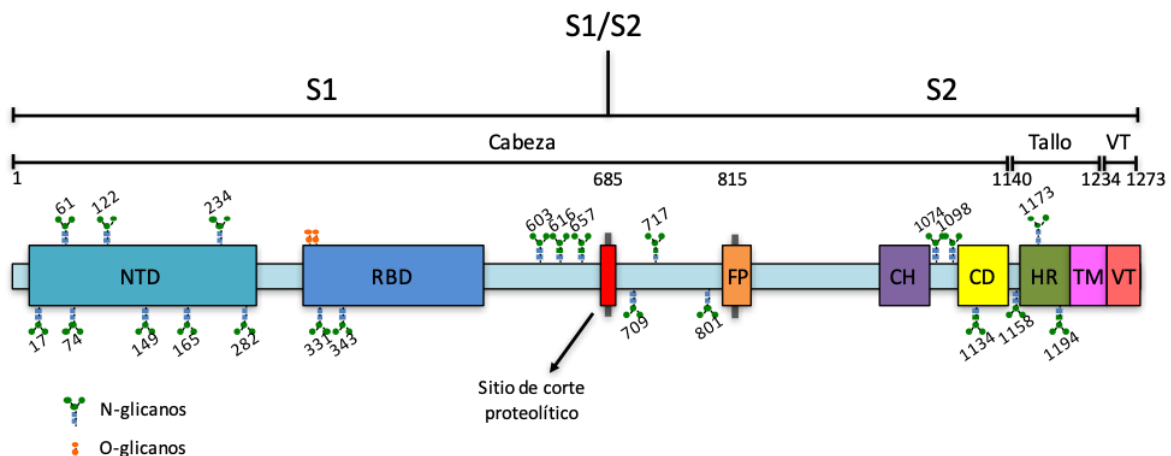


Figura 2. Secuencia primaria representativa de la proteína S monomérica del virus SARS-CoV-2. NTD, Dominio N-terminal; RBD, Dominio de Unión al Receptor; FP, Péptido de Fusión; CH, Hélice Central; CD, Dominio Conector; HR, Secuencias Repetidas de siete Aminoácidos; TM, Dominio Transmembranal; VT, Cola Viroplasmática.

los enfermos de COVID-19 (Premkumar et al., 2020), por lo tanto, la proteína S y particularmente el RBD son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

Afortunadamente, desde inicios de 2021 se contó con diferentes vacunas,

fundamentalmente vacunas de ARN y vectores adenovirales, las cuales ulteriormente entregan el material genético de la proteína S del virus o su RBD para que el propio organismo sintetice subunidades proteicas que funcionen como moléculas

inmunogénicas (Mendonca et al., 2021; Roncati & Corsi, 2021). Dichas vacunas fueron aprobadas por la OMS para su uso de emergencia y actualmente se encuentran en pruebas clínicas de fase IV (ensayo clínico en el que se estudian los efectos secundarios a largo plazo). Dichas vacunas, aun cuando han presentado diferentes porcentajes de eficacia, permitieron disminuir significativamente la propagación de la pandemia.

Actualmente se encuentran en fase preclínica y clínica cientos de candidatos de vacunas y de naturaleza muy diferente: desde las más novedosas de ARN, vectores virales no replicantes, ADN, vectores virales replicantes, de partículas pseudo virales y de las propias proteínas virales producidas de forma recombinante, hasta las más tradicionales de virus atenuados e inactivados (Chung et al., 2021; Venkadapaty et al., 2021) (Figura 3).

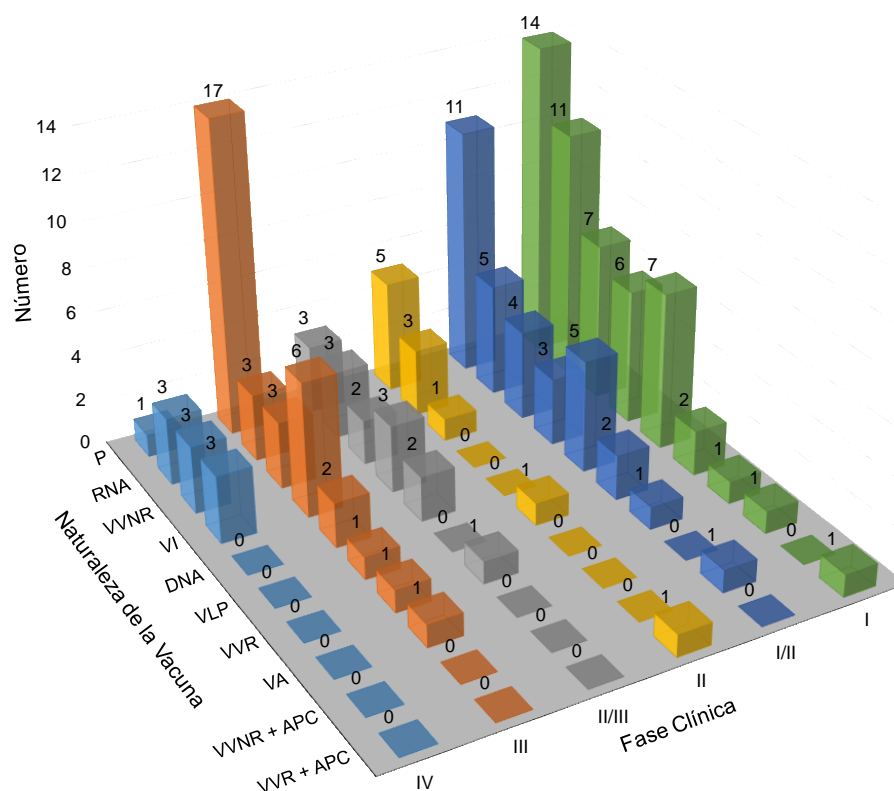


Figura 3. Vacunas anti COVID-19 en pruebas clínicas.

Naturaleza del candidato de vacuna: P, péptido o proteína viral; RNA, de ácido ribonucleico; VVNR, vector viral no replicante; VI, virus inactivado; DNA, de ácido desoxirribonucleico; VLP, partícula pseudo-viral; VVR, vector viral replicante; VA, virus atenuado; VVNR+APC, vector viral no replicante + célula presentadora de antígeno; VVR+APC, vector viral replicante + célula presentadora de antígeno. Fuente: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (al 01 de Abril de 2022)

Es muy interesante observar que a la fecha (01 de abril de 2022), de los 196 candidatos de vacuna en pruebas pre-clínicas anti COVID-19, 75 se basan en proteínas virales producidas de forma recombinante (representando el 38%). De los 151 candidatos ya en pruebas clínicas de fase I hasta IV, 51 se basan en proteínas recombinantes virales (representando el 33%)

(<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Actualmente se cuenta ya con una vacuna basada en proteínas virales en pruebas clínicas de fase IV, aunque no ha sido aprobada por la OMS para su uso de emergencia. Sin embargo, en el mes de diciembre de 2021, la vacuna Nuvaxovid (NVX-CoV2373) de la farmacéutica

estadounidense Novavax es la primera vacuna basada en proteínas virales aprobada por la OMS para su uso de emergencia (<https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccines-covid-19-vaccine-eul-issued>). Además, de los 34 candidatos de vacuna en fase III (estudio previo a la aprobación, en donde se prueba la seguridad y eficacia en miles de individuos), 17 candidatos (representando el 50%) son de proteínas virales (particularmente la Proteína S y su RBD). Dichas proteínas son producidas de forma recombinante en diferentes sistemas de expresión, siendo las células de mamífero (CHO y HEK), el sistema de células de insecto-baculovirus y la producción en levaduras (específicamente en *Pichia pastoris*) los sistemas de expresión más utilizados (Tabla 1). (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Sistemas de expresión recombinante para producción de proteínas S y RBD

Las vacunas basadas en proteínas virales recombinantes, además de ser muy seguras en virtud de no contener material genético, ni virus o partes de él, se fabrican con una tecnología bien establecida que puede solucionar la demanda de vacunas y a menor costo que las vacunas basadas en ácidos nucleicos (Gupta et al., 2019). Dada la inminente necesidad de vacunas anti COVID-19 para frenar la pandemia, es muy interesante notar la diversidad de sistemas de expresión que se han utilizado para la producción de candidatos de vacunas basados en las proteínas S y RBD del SARS-CoV-2. Desde métodos innovadores como la producción de péptidos sintéticos, los cuales no requieren de un sistema vivo de expresión (Ryzhikov et al., 2021; Guirakhoo et al., 2020), hasta sistemas de expresión en plantas con resultados muy prometedores (A Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Reactogenicity of an RBD-Fc-based Vaccine to Prevent COVID-19, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04953078>; KBP-201 COVID-19 Vaccine Trial in Healthy Volunteers, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04473690>). Este último quizá con la desventaja

de no tener la capacidad para satisfacer la demanda requerida de vacunas en una situación de pandemia, además del potencial para desencadenar reacciones inmunológicas o alérgicas no deseadas derivado del tipo de glicosilación de proteínas que producen las células de planta (Gomord et al., 2005; Margolin et al., 2020).

Recientemente Tripathi & Shrivastava (2019), publicaron una revisión al respecto de los avances recientes en bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes en general, abarcando todos los sistemas de expresión disponibles hasta la fecha, así como los avances en el desarrollo de procesos. Por su parte Pollet et al. (2021) a inicios de 2021, publicó una revisión referente a la situación de las vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas recombinantes, abarcando diferentes aspectos; desde las tecnologías de producción, hasta las vías de administración y los adyuvantes más utilizados.

Expresión en bacterias (E. Coli)

La expresión recombinante de proteínas en bacterias es el sistema más económico y escalable para la producción de proteínas a nivel industrial, particularmente para la producción de proteínas recombinantes pequeñas como hormonas (insulina y hormona de crecimiento entre otras), factores de crecimiento, interferones e interleucinas (Gupta & Shukla, 2016; Walsh, 2018). La mayoría de dichas moléculas son producidas en *Escherichia coli*. En el caso de producción de proteínas recombinantes para vacunas, existen dos vacunas aprobadas recientemente por la FDA contra la enfermedad meningocócica causada por *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Dichas vacunas se producen también en *E. coli* (Rivero-Calle et al., 2019). El sistema de expresión en bacterias (procariotas) tiene la limitante de no poseer una maquinaria secretoria, por lo tanto, no glicosila las proteínas, no forma puentes disulfuro adecuadamente y no las secreta al medio de cultivo; las acumula intracelularmente como cuerpos de inclusión. Las proteínas deben ser extraídas, solubilizadas y replegadas *in vitro* (Jefferis, 2007). En el caso de producción de proteínas virales del SARS-CoV-2 como candidatos vacunales anti COVID-19, existen

algunos desarrollos en bacterias en pruebas pre-clínicas

(<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Landscape of candidate vaccines in pre-clinical development). Sin embargo, dicho sistema de expresión no figura entre los más utilizados por los candidatos de vacuna en pruebas clínicas más avanzadas (Fase III y IV) y con mayores posibilidades para su aprobación a corto plazo. Lo anterior probablemente por la preocupación de que en dicho sistema de expresión no es posible obtener las modificaciones postraduccionales necesarias para el correcto plegamiento de la proteína S o su RBD (como glicosilación y formación de puentes disulfuro) y que pudieran impactar en la antigenicidad de la molécula (Peng et al., 2021). En virtud de lo anterior, los sistemas de expresión en levaduras y células animales (células de mamífero e insecto) han sido las tecnologías seleccionadas para generar los candidatos de vacuna anti COVID-19 que actualmente se encuentran en ensayos clínicos de fase III y IV y con mayor posibilidad de ser aprobados a corto plazo.

(<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Expresión en levadura

En los últimos años las levaduras se han posicionado como una herramienta biotecnológica prometedora para la producción de proteínas recombinantes, particularmente para uso terapéutico. Los avances en el mejoramiento de las células, tanto a nivel genético como del bioproceso de producción, han hecho que este sistema de expresión sea una excelente opción para la producción de proteínas más complejas que anteriormente se producían exclusivamente en células de mamífero (Baghban et al., 2019). Se puede considerar que el sistema de expresión en levaduras posee las ventajas tanto de los sistemas de expresión bacterianos como de células animales. Al igual que las bacterias, las levaduras poseen una alta velocidad de crecimiento, alcanzan altas densidades celulares y la producción se puede escalar fácilmente a volúmenes muy grandes. Su medio de cultivo es, por mucho, más económico que los utilizados en cultivos

de células animales y recientemente los títulos de proteína recombinante se han incrementado sustancialmente en este sistema de expresión (Huang et al., 2018). Con respecto a las bondades que comparte con los cultivos de células animales, las levaduras poseen una maquinaria secretoria que les permite producir proteínas glicosiladas, correctamente plegadas y secretadas al medio de cultivo (Harcum, 2006). Entre las líneas celulares de levadura más utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes para uso terapéutico se encuentran, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* (Huertas & Michán, 2019). Quizá la desventaja más grande de dicho sistema de expresión es que las levaduras no generan una glicosilación comparable a la humana, en su lugar hipermanosilan las proteínas y se puede presentar el inconveniente de desencadenar respuestas inmunes indeseadas (Gupta & Shukla, 2018; Wu et al., 2002). Al igual que en bacterias, el sistema de expresión en levaduras se utiliza exitosamente para la producción de hormonas recombinantes (predominantemente insulina, producida en *S. cerevisiae*), factores sanguíneos y de crecimiento. En el área de vacunas, *H. polymorpha* y *S. cerevisiae* son el sistema de expresión para la mayoría de las vacunas recombinantes producidas contra hepatitis B y dos contra la infección por el virus del papiloma humano (Walsh, 2018). En el caso de candidatos de vacuna contra COVID-19 en ensayos clínicos de fase III, de los 17 candidatos que hay a la fecha, dos utilizan levaduras como su sistema de expresión (Tabla 1). En ambos desarrollos utilizan *P. pastoris* como línea celular de expresión y también en ambos casos producen únicamente al dominio RBD de la proteína S del virus (Limonta-Fernandez et al., 2021; Pollet et al., 2021a).

Una ventaja de expresar proteínas recombinantes glicosiladas en *P. pastoris*, en comparación con otras levaduras como *S. cerevisiae*, es que produce glicanos no tan hipermanosilados y ramificados (hasta manosa 13), lo cual reduce la posibilidad de respuestas inmunogénicas no deseadas. En el caso de la vacuna Abdala del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de

Cuba, derivado de los resultados de su ensayo clínico de Fase III, reportan un 92.28% de eficacia frente a la enfermedad sintomática y 100% en la prevención de la enfermedad sistémica severa y la muerte. No reportan porcentaje de eficacia contra la infección (www.cigb.edu.cu/wp-content/uploads/2021/04/Ficha-Abdala-Espanol-3-sep-2021.pdf). Dicha vacuna, aun cuando no ha recibido aprobación para su uso de emergencia por la OMS, es la primera vacuna de origen proteico que cuenta con aprobación para su uso de emergencia en Cuba, Venezuela, Nicaragua y Vietnam (www.cigb.edu.cu/wp-content/uploads/2021/04/Hitos-Abdala.pdf).

Expresión en células de insecto

El cultivo de células de insecto data de principios de los años 60's cuando se establecieron las primeras líneas celulares de lepidópteros (células de polillas o palomillas obtenidas en su estado de pupa) (Grace, 1962) y ya como sistema de expresión de proteínas recombinantes a partir de los años 80's (Smith et al., 1983). La producción de proteínas recombinantes en células de insecto es un proceso de dos etapas en donde las células son primero cultivadas hasta una determinada concentración celular y luego infectadas con un baculovirus (virus que infectan artrópodos) recombinante al cual se le ha clonado el gen de la proteína que se desea producir (Palomares et al., 2006).

En comparación con los demás sistemas de expresión, el de células de insecto-baculovirus es muy versátil, se puede utilizar para la producción de proteínas recombinantes, partículas pseudovirales y virus. Existen diferentes líneas celulares que se pueden utilizar, entre las más comúnmente utilizadas se encuentran las Sf9, Sf21 (de *Spodoptera frugiperda*, o gusano cogollero del maíz) y High Five™ (de *Trichoplusia ni*, u oruga de la col) (Contreras-Gómez et al., 2013). Es un sistema de fácil manipulación y escalamiento de la producción, además de ser un sistema de expresión altamente seguro en términos de bioseguridad ya que los baculovirus solo se replican en invertebrados (Bollati-Fogolín & Comini, 2008). Las dos limitaciones más importantes que este sistema de expresión puede tener son:

primero, que la producción de las proteínas es discontinua, es decir, se debe hacer en lotes debido a que durante el proceso de infección de las células con los baculovirus hay lisis y muerte celular. El segundo factor tiene que ver con el perfil de glicosilación. Si bien las células de insecto glicosilan las proteínas, no lo hacen igual que las células de mamífero. La glicosilación de las células de insecto es más simple que la de mamífero, caracterizada por estructuras de tipo paucimanosa (Shi & Jarvis, 2007). Lo anterior es de particular importancia cuando se desea producir proteínas recombinantes terapéuticas (Goh & Ng, 2018). En comparación con los cultivos bacterianos o de levadura, en los cultivos de células de insecto la proliferación es más lenta; utilizan medios de cultivo más complejos y por tanto más costos, casi al mismo nivel que los medios de cultivo para cultivos de células de mamífero. En comparación con estos últimos, las células de insecto alcanzan mayores densidades celulares en menor tiempo (Burgener & Butler, 2006; Gorfien, 2007; Moraes et al., 2008).

En la actualidad el sistema de expresión en células de insecto-baculovirus se ha consolidado como una tecnología exitosa para la producción de vacunas (Cox et al 2011). Existen en el mercado dos vacunas recombinantes producidas en células de insecto; Cervarix® de GlaxoSmithKline, es una vacuna para la prevención del cáncer cérvico-uterino ocasionado por el virus del papiloma humano. Dicha vacuna está hecha de partículas pseudo-virales a base de la proteína L1 de la cápside del virus (Walsh, 2018; Buck et al, 2013). La segunda vacuna es Flublok® de Protein Sciences (ahora parte de Sanofi Pasteur), una vacuna cuadrivalente contra la influenza estacional basada en la proteína hemaglutinina de 4 diferentes tipos de influenza A y B circulantes. (Walsh, 2018; <https://www.sanofiflu.com/flublok-quadrivalent-influenza-vaccine/>).

En el caso de candidatos de vacuna contra COVID-19, el sistema de expresión en células de insecto es el segundo más utilizado (después del de células de mamífero) para la producción de la proteína S o su RBD. De los 17 candidatos de vacuna en estudios clínicos

de Fase III, cinco se desarrollaron en células de insecto (Tabla 1).

La vacuna NVX-CoV2373 de la farmacéutica Novavax consiste en una nanopartícula multimérica de la proteína S trimérica. Es la única vacuna producida en células de insecto que cuenta con resultados de uno de sus estudios clínicos de fase III y fue recientemente aprobada (diciembre de 2021) por la OMS para su uso de emergencia. Reporta una eficacia del 89.7% contra la infección (Heath et al., 2021).

Es interesante mencionar que tanto la hemaglutinina del virus de la influenza como la proteína S del SARS-CoV-2 son proteínas de fusión de clase I de la superficie del virus, altamente glicosiladas y cuya función es establecer el primer contacto con la célula blanco. Adicionalmente, ambos virus son pandémicos y tienen una alta tasa de mutación, generándose variantes en periodos de tiempo cortos. Para la generación de vacunas basadas en proteínas recombinantes y virus con las características arriba mencionadas, se requiere de sistemas de expresión muy fáciles de manipular genéticamente y con la capacidad de generar altas concentraciones de proteínas virales de las nuevas variantes en tiempos muy cortos (Krause et al., 2021; Sanyaolu et al., 2021). El sistema de expresión en células de insecto tiene dicha ventaja sobre los demás sistemas de expresión. Un ejemplo de lo anterior es la vacuna FluBlock para la influenza estacional de la Farmacéutica Sanofi Pasteur y parece ser que ahora también con su candidato de vacuna anti COVID-19 (VAT00002) basada en la proteína S producida en la misma plataforma de expresión (Cox, 2009; <https://pactr.samrc.ac.za/TrialDisplay.aspx?TrialID=13475>; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04904549>).

Expresión en células de mamífero

Las células de mamífero son el sistema de expresión por excelencia para la producción de muchas proteínas recombinantes de uso terapéutico con características similares a las proteínas nativas humanas (Ozturk, 2006). Particularmente proteínas grandes y

complejas como son los anticuerpos monoclonales y demás proteínas humanas con un alto valor agregado en el mercado farmacéutico y que requieren de modificaciones postraduccionales (como formación de puentes disulfuro y/o glicosilación) para el correcto plegamiento de la proteína y por ende para preservar su función biológica como molécula terapéutica (Butler, 2008; Hossler, 2012; Walsh, 2018). Sin embargo, este sistema de expresión es el más costoso en virtud de las características propias del bioproceso con células animales (por la complejidad de los medios de cultivo, los tiempos largos de cultivo, la escalabilidad del cultivo, etc.). Existen diferentes líneas celulares que se pueden utilizar para la producción a nivel industrial (CHO, HEK, BHK, PER-C6), sin embargo, las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) son la línea celular más ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas (Tihanyi & Nyitray, 2021). Aun cuando las células de mamífero no son el sistema de expresión tradicional para la producción de vacunas basadas en proteínas virales, existen ejemplos como el de la vacuna para herpes zóster Shingrix producida por GlaxoSmithKline, la cual utiliza células CHO para la producción de la glicoproteína E del virus como antígeno vacunal (Norden et al., 2019). De forma muy interesante, para la producción de candidatos de vacunas anti COVID-19 ya sea para la expresión de la proteína S o el dominio RBD del virus SARS-CoV-2, las células de mamífero representan el sistema de expresión más utilizado en los candidatos en pruebas clínicas más avanzadas. Lo anterior se puede explicar en virtud de la complejidad estructural de la proteína S o su RBD y que mediante su producción en células de mamífero se garantice su integridad estructural y por tanto su inmunogenicidad (Henderson et al., 2020; Reis et al., 2021). De los 17 candidatos de vacunas en pruebas clínicas de fase III, ocho se desarrollaron mediante expresión en células de mamífero; siete en células CHO y uno en HEK293 (Tabla 1) (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Artículos

Tabla 1. Candidatos de vacuna anti COVID-19 basadas en proteínas virales recombinantes de SARS-CoV-2, en ensayos clínicos de fase III y IV (al 01 de abril de 2022)

No.	Descripción	Sistema de expresión	No. Dosis	Esquema de vacunación (días)	Desarrollador	País	Fase del estudio
1	Proteína S trimérica	Células de insecto	2	0 + 21	Novavax	EUA	III
2	RBD dimérico	Células CHO	2-3	0 + 28 o 0 + 28 + 56	Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical + Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences	China	III
3	Proteína S	Células de insecto	2	0 + 21	Sanofi Pasteur+GSK	EUA/UK	III
4	Proteína S trimérica	Células CHO	2	0 + 21	Clover Biopharmaceuticals Inc./Dynavax	China	III
5	Proteína S	Células de insecto	2	0 + 21	Vaxine Pty Ltd./CinnaGen Co.	AUS/Irán	III
6	Proteína S	Células CHO	2	0 + 28	Medigen Vaccine Biologics + Dynavax + National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Taiwán/ EUA	IV
7	Múltiplo de RBD	Células CHO	2	0 + 28	Instituto Finlay de Vacunas	Cuba	III
8	RBD	Células de insecto	2	0 + 28	West China Hospital + Sichuan University	China	III
9	RBD	Levadura	3	0 + 14 + 28 o 0 + 28 + 56	Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB)	Cuba	III
10	RBD	Levadura	2	0 + 28	Biological E. Limited / Texas Children's Center for Vaccine Development	India/EU A	III
11	Proteína S	Células CHO	2	0 + 21	Nanogen Pharmaceutical Biotechnology	Vietnam	III
12	RBD	Células 293F	2	0 + 28	SK Bioscience Co., Ltd. and CEPI / Washington University	Corea/EU A	III
13	Proteína S	Células de insecto	2	0 + 21	Shionogi	Japón	III
14	Proteína S	ND	3	0 + 21 + 51	Razi Vaccine and Serum Research Institute	Irán	III
15	RBD dimérico	Células CHO	2	0 + 21	Livzon Pharmaceutical	China	III
16	RBD	ND	3	0 + 21 + 35	Bagheiat-allah University of Medical Sciences/AmitisGen	Irán	III
17	RBD dimérico	Células CHO	2	0 + 21	Laboratorios Hipra, S.A.	España	III

Fuente: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.

Recientemente, el Instituto Finlay de Vacunas de Cuba, reportó en resultados intermedios de su ensayo clínico de fase III para su vacuna Soberana02, un 62% de eficacia contra la infección por COVID-19 en su esquema de dos dosis (www.finlay.edu.cu/blog/fichas-de-soberana/). Soberana02 consiste en un multímero (4 a 8 moléculas) de RBD producido en células CHO, conjugados covalentemente a toxoide tetánico (Valdez-Balbin et al., 2021, 2021a). Dicha vacuna aún no ha sido autorizada por la OMS, sin embargo, cuenta con autorización para su uso de emergencia en Cuba e Irán. En otro estudio clínico de Fase II donde se evaluó un esquema heterólogo de tres dosis, dos con la vacuna Soberana02 y una tercera dosis con su vacuna SoberanaPlus, se determinó una eficacia de 75.5% contra la infección; 91.2% contra la enfermedad sintomática y 100% contra la enfermedad sintomática severa y muerte (www.finlay.edu.cu/blog/fichas-de-soberana/). Soberana Plus es una vacuna de RBD dimerico (sin toxoide tetánico) producida en células CHO (Chang-Monteaquedo et al., 2021).

Conclusiones y perspectivas a corto plazo

Al 01 de abril de 2022 el SARS-CoV-2 ha infectado de COVID-19 a 5.65 millones de mexicanos, de los cuales 323,000 (5.7%) perdieron la vida. Ya se cuenta con diferentes vacunas aprobadas para su uso de emergencia, sin embargo, solamente se ha vacunado con esquema completo al 62.5% de la población. Actualmente se encuentran en fase preclínica y clínica cientos de candidatos de vacunas: desde las más novedosas de ARN, vectores virales no replicantes, ADN, vectores virales replicantes, de partículas pseudo virales y de las propias proteínas virales producidas de forma recombinante, hasta las más tradicionales de virus atenuados e inactivados. Las vacunas basadas en la proteína S y su dominio RBD del virus SARS-CoV-2 representan una alternativa para coadyuvar en el proceso de vacunación debido a su eficacia, seguridad, escalabilidad y menor costo. De los 34 candidatos de vacuna en fase III, 17

candidatos son de proteínas virales (representando el 50%) producidas de forma recombinante. Para el desarrollo de dichas vacunas se han utilizado todos los sistemas de expresión disponibles: bacterias, levaduras, plantas y células animales (mamífero e insecto). Dada las características estructurales de la proteína S o su RBD se ha seleccionado preferentemente su producción en células de mamífero e insecto y en menor proporción en células de levadura. Los datos de eficacia que se han reportado a la fecha, por lo menos uno para cada sistema de expresión, muestran que las vacunas son eficaces, independientemente de las desventajas inherentes a cada sistema de expresión. En diciembre de 2021 la OMS aprobó para su uso de emergencia la primera vacuna ante COVID-19 basada en proteínas virales producidas de forma recombinante y ya se cuenta con una vacuna en estudio clínico de fase IV. En los últimos cuatro meses, el número de candidatos de vacuna en fase III basadas en proteínas virales se incrementó de 12 a 17. Lo anterior refleja la factibilidad de que en el corto plazo se cuente con diferentes vacunas anti COVID-19 basadas en proteínas recombinantes para sumarse en el proceso de vacunación, particularmente en países en desarrollo y de bajo ingreso económico en los cuales el proceso de vacunación ha sido muy lento.

Referencias

- Abdelrahman Z, Li M, Wang X (2020) Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front. Immunol.* 11:552909. doi: 10.3389/fimmu.2020.552909.
- Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Ali Mafi A, Hoseinpoor R, Rahbarnia L, Aria M (2019) Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Mol Biotechnol* 61:365–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>.

- Bollati-Fogolín M, Comini MA (2008) Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. Chapter 3. In *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. Castilho L, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (eds) Taylor & Francis. USA. pp. 39-74.
- Buck ChB, Day PM, Trus BL (2013) The Papilloma Major Capsid Protein L1. *Virology*. October; 445(0):169–174. doi:10.1016/j.virol.2013.05.038.
- Burgener A, Butler M (2006) Medium development. Chapter 3. In *cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies*, Ozturk S, Hu WS (eds) Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Butler M (2008) Post-translational modification of recombinant proteins. Chapter 6. In *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Castilho L, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (eds) Taylor and Francis. USA. pp. 129-143.
- Chang-Monteagudo A, Ochoa-Azze R, Climent-Ruiz Y, Macías-Abraham C, Rodríguez-Noda L, Valenzuela-Silva C, Sánchez-Ramírez B, Perez-Nicado R, Hernández-García T, Orosa-Vázquez I, Díaz-Hernández M, García-García M, Jerez-Barceló Y, Triana-Marrero Y, Ruiz-Villegas L, Rodríguez-Prieto LD, Puga-Gómez R, Guerra-Chaviano PP, Zúñiga-Rosales Y, Marcheco-Teruel B, Rodríguez-Acosta M, Noa-Romero E, Enríquez-Puertas J, Porto-González D, Fernández-Medina O, Valdés-Zayas A, Chen GW, Herrera-Martínez L, Valdés-Balbín Y, García-Rivera D, Verez-Bencomo V (2021) A single dose of SARS-CoV-2 FINLAY-FR-1A vaccine enhances neutralization response in COVID-19 convalescents, with a very good safety profile: An open-label phase 1 clinical trial. *The Lancet Regional Health - Americas*, Volume 4, 100079, <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.10.0079>.
- Chung JY, Thone MN, Kwon YJ (2021) COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 170:1-25. doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011.
- Cioffi A, Cioffi F (2021) COVID-19 vaccine: Risk of inequality and failure of public health strategies. *Ethics, Med. Public Health*. 17:100653. <https://doi.org/10.1016/j.jemep.2021.100653>.
- Contreras-Gómez A, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Molina-Grima E, Chisti Y (2013) Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol. Prog.*, 30:1-18. <https://doi.org.8080/10.1002/btpr.1842>.
- Cox MMJ (2009) Development of an influenza virus vaccine using the baculovirus insect cell expression system. Implications for pandemic preparedness. Ph.D. Thesis. Wageningen University. Wageningen, Netherlands. Pp.136. ISBN 978-90-8585-479-1. <https://edepot.wur.nl/14323>.
- Cox MMJ, Hashimoto Y (2011) A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 107, Supplement, July2011, pp. S31-S41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.003>.
- Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M (2017) Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes *Trends Microbiol*, January, Vol. 25, No. 1, pp. 35-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>
- Grace TDC (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature*.195:788–789.
- Guirakhoo F, Kuo L, Peng J, Huang JH, Kuo B, Lin F, Liu K, Liu Z, Wu G, Ding S, Hou LL, Cheng J, Yang V, Jiang H, Wang J, Chen T, Xia W, Lin E, Hung

- Ch H, Chen K, Shih Z, Lin Y, Schurter BT, Hu MM, Heppner G, Malherbe DC, Bukreyev A, Hellerstein M, Monath T, Wang CY (2020) A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an Adeno Associated Virus Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (AAV hACE2) Mouse Model. Nov, 30. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.30.399154>.
- Goh JB, Ng SK (2018) Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6):851-867, DOI: 10.1080/07388551.2017.1416577.
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Foye L (2005) Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* 23: 559–65.
- Gorfien SF (2007) Cell culture media development: customization of animal origin-free components and supplements. Chapter 5. In: *Cell Culture and Upstream Processing*. Butler M. (ed) Taylor & Francis. pp. 81-102.
- Gupta SK, Dangi AK, Smita M, Dwivedi S (2019) Effectual bioprocess development for protein production, in *Applied Microbiology and Bioengineering*, ed P. Shukla (London: Academic Press), 203–227. doi: 10.1016/B978-0-12-815407-6.00011-3.
- Gupta SK, and Shukla P (2016) Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 1089–1098. doi: 10.3109/07388551.2015.1084264.
- Gupta SK Shukla P (2018) Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102:10457–10468.
- <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9430-6>.
- Harcum SW (2006) Protein Glycosylation. Chapter 5. In *cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies*, Ozturk S. and Hu W.S. (eds). Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, Ludden C, Reeve R, Rambaut A, Peacock SJ, Robertson DL (2021) SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* 19(7):409-429. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
- Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, Chadwick DR, Clark R, Cosgrove C, Galloway J, Goodman AL, Heer A, Higham A, Iyengar S, Jamal A, Jeanes C, Kalra PA, Kyriakidou C, McAuley DF, Meyrick A, Minassian AM, Minton J, Moore P, Munsoor I, Nicholls H, Osanlou O, Packham J, Pretswell CH, San Francisco Ramos A, Saralaya D, Sheridan RP, Smith R, Soiza RL, Swift PA, Thomson EC, Turner J, Viljoen ME, Albert G, Cho I, Dubovsky F, Glenn G, Rivers J, Robertson A, Smith K, Toback S, the 2019nCoV-302 Study Group (2021). Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine.* 385(13):1172–1183. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>.
- Henderson R, Edwards RJ, Mansouri K, Janowska K, Stalls V, Kopp M, Haynes BF, Acharya P (2020) Glycans on the SARS- CoV-2 spike control the receptor binding domain conformation. *bioRxiv.* Jun 30;2020.06.26.173765. <https://doi.org/10.1101/2020.06.26.173765>.
- Hoffmann C, Kamps BS (2021) In: Kamps B.S. & Hoffman C. (eds.). *Clinical Presentation. COVID Reference 6th*

- edition (Chapter 8). Steinhauser Verlag. <https://covidreference.com/>.
- Hossler P (2012) Protein Glycosylation Control in Mammalian Cell Culture: Past Precedents and Contemporary Prospects. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* DOI: 10.1007/10_2011_113.
- Huang M, Wang G, Qin J, Petranovic D, Nielsen J (2018) Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E11025–E11032. doi: 10.1073/pnas.1809921115.
- Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S (2020) Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica.* 41:1141-1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.
- Huertas MJ, Michán C (2019) Paving the way for the production of secretory proteins by yeast cell factories. *Microb. Biotechnol.* 12, 1095–1096. doi: 10.1111/1751-7915.13342.
- Jefferis R (2007) Post-translational modifications of recombinant antibody proteins. Chapter 6. In: *Cell Culture and Upstream Processing*. Butler M (ed.) Taylor & Francis. pp. 103-130.
- Krause PR, Fleming TR, Longini IM, Peto R, Briand S, Heymann DL, Beral V, Snape MD, Rees H, Roper A, Balicer RD, Cramer JP, Muñoz-Fontela C, Gruber M, Gaspar R, Singh JA, Subbarao K, Van Kerkhove MD, Swaminathan S, Ryan MJ, Henao-Restrepo A (2021) SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. *N. Engl. J. Med.* doi: 10.1056/NEJMSr2105280.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* Vol. 581:215-220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.
- Li W, Zhang Ch, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong S, Huang I, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, Farzan M (2005) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24:1634–1643.
- Limonta-Fernández M, Chinea-Santiago G, Martín-Dunn AM, Gonzalez-Roche D, Bequet-Romero M, Marquez-Perera G, González-Moya I, Canaan-Haden-Ayala C, Cabrales-Rico A, Espinosa-Rodríguez LA, Ramos-Gómez Y, Andujar-Martínez I, González-López LJ, Perez de la Iglesia M, Zamora-Sanchez J, Cruz-Sui O, Lemos-Pérez G, Cabrera-Herrera G, Valdes-Hernández J, Martinez-Diaz E, Pimentel-Vazquez E, Ayala-Avila M, Guillén-Nieto G (2021) The SARS-CoV-2 receptor-binding domain expressed in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. Jul, 03. medRxiv 2021.06.29.21259605; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.29.21259605>
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet.* 395(10224):565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- Margolin E, Crispin M, Meyers A, Chapman R, Rybicki EP (2020) A Roadmap for the Molecular Farming of Viral Glycoprotein Vaccines: Engineering Glycosylation and Glycosylation-Directed Folding. *Front Plant Sci.* Dec

- 3;11:609207.doi:
10.3389/fpls.2020.609207.
- Mendonca SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT (2021) Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *npj Vaccines* 6:97. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>.
- Moraes AM, Zucatelli-Mendonca R, Torres-Suazo CA (2008) Culture media for animal cells. Chapter 5. In *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Castilho L., Moraes A. M., Augusto EFP & Butler M (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 111-128.
- Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, Agha M, and Agha R (2020) The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int. J. Surg.* 78:185–193. doi.org/10.1016/j.ijvsu.2020.04.018
- Norden R, Nilsson J, Samuelsson E, Risinger C, Sihlbom C, Blixt O, Larson G, Olofsson S, Bergstrom T (2019) Recombinant glycoprotein E of varicella zoster virus contains glycan-peptide motifs that modulate B cell epitopes into discrete immunological signatures. *Int. J. Mol. Sci.* Feb 22;20(4):954. doi: 10.3390/ijms20040954.
- Ozturk SS (2006) Cell culture technology-an Overview. In *cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies*, Ozturk S & Hu WS (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 1-13.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT (2006) Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System. Chapter 18. In *cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies*, Ozturk S, & Hu WS (eds.) Taylor & Francis. USA. pp. 627-692.
- Perlman S, McIntosh K (2019) Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. and Douglas M. *Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, p. 2072. Elsevier Inc. <https://expertconsult.inkling.com/read/bennett-mandell-douglas-principle-practice-infect-diseases-9e/chapter-155/coronaviruses-including-severe>.
- Peng X, Cheng J, Gong H, Yuan M, Zhao X, Li Z, Wei D (2021) Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. *Mil. Med. Res.* 8:67. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00360-1>.
- Pillay TS (2020) Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J. Clin. Pathol.* 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658.
- Pollet J, Chen WH, Strych U (2021) Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 170:71–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>.
- Pollet J, Chen WH, Versteeg L, Keegan B, Zhan B, Wei J, Liu Z, Lee J, Kundu R, Adhikari R, Poveda C, Villar MJ, Leao AC, Rivera JA, Momin Z, Gillespie PM, Kimata JT, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME (2021a) SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. Apr, 13. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, DOI: 10.1080/21645515.2021.1901545.
- Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann A, Cornaby C, Bartelt L, Weiss S, Park Y, Edwards CE, Weimer E, Scherer EM, Roupheal N, Edupuganti S, Weiskopf D, Tse LV, Hou YJ, Margolis D, Sette A, Collins MH, Schmitz J, Baric RS, de Silva AM (2020) The receptor binding domain of the viral spike protein is an

- immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* Jun 11;5(48):eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
- Rahman M, Islam M (2021) Early approval of COVID-19 vaccines: Pros and cons. *Hum. Vaccines Immunother.* 17(10):3288-3296. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1944742>.
- Reis CA, Tauber R, Blanchard V (2021) Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection. *J Mol Med (Berl)*. Aug;99(8):1023-1031. doi:10.1007/s00109-021-02092-0.
- Rivero-Calle I, Raguindin PF, Gómez-Rial J, Rodríguez-Tenreiro C, Martínón-Torres F (2019) Meningococcal Group B Vaccine For The Prevention Of Invasive Meningococcal Disease Caused By Neisseria meningitidis Serogroup B. *Infection and drug resistance*, 12, 3169–3188. doi.org/10.2147/IDR.S159952
- Roncati L, Corsi L (2021) Nucleoside-modified messenger RNA COVID-19 vaccine platform. *J Med Virol.* 93:4054–4057. DOI: 10.1002/jmv.26924.
- Ryzhikov AB, Ryzhikov EA, Bogryantseva MP, Danilenko ED, Imatdinov IR, Nechaeva EA, Pyankov OV, Pyankova OG, Susloparov IM, Taranov OS, Gudymo As, Danilchenko NV, Sleptsova ES, Bodnev SA, Onkhonova GS, Petrov VN, Moiseeva AA, Torzhkova PY, Pyankov SA, Tregubchak TV, Antonets DV, Gavrilova EV, Maksyutov RA (2021) Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-CoV-2. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(1):5–19.
- Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Haider N, Abbasi AF, Jafari U, Prakash S, Balendra V (2021) The emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Ther Adv Infect Dis.* Jun 18;8:204993612111024372. doi: 10.1177/204993612111024372.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, Vol. 581:221-224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>.
- Shi X, Jarvis DL (2007) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr. Drug Targets* 8:1116–1125.
- Singh D, Yi SV (2021) On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp. Mol. Med.* 53:537–547. doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3:2156–2165.
- Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, Douangboubpha B, Karami Y, Chrétien D, Sanamxay D, Xayaphet V, Paphaphanh P, Lacoste V, Somlor S, Lakeomany K, Phommavanh N, Pérot P, Dehan O, Amara F, Donati F, Bigot T, Nilges M, Rey FA, van der Werf S, Brey T, Eloit M (2022) Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature.* Accelerated Article Preview. Published online 16 February 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>
- Tihanyi B, Nyitray L (2021) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies.* Available online 12 Apr 2021. doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003.
- Tripathi NK, Shrivastava (2019) Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Font. Bioeng. Biotechnol.* 7:420. doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420.

- Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Quintero L, Fernández S, Rodríguez L, Sanchez-Ramirez B, Perez-Nicado R, Acosta C, Méndez Y, Ricardo MG, Hernandez T, Bergado G, Pi F, Valdes A, Carmentate T, Ramirez U, Oliva R, Soubal J-P, Garrido R, Cardoso F, Landys M, Gonzalez H, Farinas M, Enriquez J, Noa E, Suarez A, Fang Ch, Espinosa LA, Ramos Y, Luis González LJ, Climent Y, Rojas G, Relova-Hernández E, Cabrera-Infante Y, Losada SL, Boggiano T, Ojito E, León K, Chiodo F, Paquet F, Chen GW, Rivera DG, Garcia-Rivera D, Verez-Bencomo V (2021) SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies. *ACS Chem. Biol.* 16:1223–1233. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00272>.
- Valdes-Balbin Y, Santana-Mederos D, Paquet F, Fernandez S, Climent Y, Chiodo F, Rodríguez L, Sanchez-Ramirez B, Leon K, Hernandez T, Castellanos-Serra L, Garrido R, Chen GW, Garcia-Rivera D, Rivera DG, Verez-Bencomo V (2021a) Molecular Aspects Concerning the Use of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a Target for Preventive Vaccines. *ACS central Science.* 7(5):757–767. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00216>.
- Venkadapathi J, Govindarajan VK, Sekaran S, Venkatapathy S (2021) A Minireview of the Promising Drugs and Vaccines in Pipeline for the Treatment of COVID-19 and Current Update on Clinical Trials. *Frontiers in Molecular Biosciences.* Jun, Volume 8, doi: 10.3389/fmolb.2021.637378.
- Walls AC, Park Y, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* Apr 16;181(2):281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36(12):1136-1145.
- Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science,* 369(6501):330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>.
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C, Abiona O, Graham BS, McLellan JS (2020) Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science,* 367, 1260–1263.
- Wu J-M, Lee Ch-K, Hsu T-A (2002) Asparagine-linked glycosylation modifications in Yeast. Chapter 9. In: *Cell Engineering, Volume 3: Glycosylation.* Al-Rubeai M (ed.) Kluwer Academic Publishers. pp. 215-231.
- Zhang Y, Zhao W, Mao Y, Chen Y, Wang S, Zhong Y, Su T, Gong M, Du D, Lu X, Cheng J, Yang H (2021) Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 20:100058. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002295>.
- Zhao P, Praissman JL, Grant OC, Cai Y, Xiao T, Rosenbalm KE, Aoki K, Kellman BP, Bridger R, Barouch DH, Brindley MA, Lewis NE, Tiemeyer M, Chen B, Woods RJ, Wells L (2020) Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host Microbe.* 28(4):586-601.e6. doi:10.1016/j.chom.2020.08.004.
- Zuckerman AJ (2009) Coronaviruses and Toroviruses. In: *Principles and Practice of Clinical Virology.* Wiley. Richman et al. (eds.). p. 511-531.