



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRABAJO ESCRITO VÍA DE CURSOS DE EDUCACIÓN
CONTINUA**

**“ESTRUCTURA, FUNCIÓN E IMPORTANCIA PARA EL
DESARROLLO DE VACUNAS DE LA PROTEÍNA ESPIGA (S) DEL
SARS-CoV-2”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA GARCÍA COLÍN

ASESORA

DRA. ADELAIDA DÍAZ VILCHIS



Ciudad Universitaria, CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Adelaida Díaz Vilchis**

VOCAL: **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto**

SECRETARIO: **Profesor: Mireya Rodríguez Penagos**

1ER. SUPLENTE: **Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres**

2DO. SUPLENTE: **Profesor: Luz Xochiquetzalli Vásquez Bochm**

FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA

SUSTENTANTE

DRA. ADELAIDA DÍAZ VILCHIS

ALEJANDRA GARCÍA COLÍN

Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. Adelaida Díaz Vilchis por sus útiles consejos cuando no encontraba la manera de plasmar las ideas en el trabajo que hoy he logrado.

A todos los profesores que aportaron en mi formación académica durante la licenciatura y el diplomado por llenarme de conocimientos y experiencias únicas.

A las doctoras Sobeida Sánchez Nieto y Mireya Rodríguez Penagos por su tiempo, correcciones y aportaciones a este escrito.

A mi mamá, María de la Luz Colín Zamora, por siempre procurarme y apoyarme durante mis estudios, tanto en mis decisiones como de forma económica.

A mi hermano, Raúl García Colín, por enseñarme lo desconocido y facilitarme el camino con su ayuda.

A mi pareja, Luis Daniel Chávez Vargas, por siempre confiar en mí, enseñarme, amarme y ayudarme en todas mis actividades.

A mis amigos Brenda Patricia, Vania, Karen y Víctor por su curiosidad, apoyo emocional y por toda la diversión que alegra mis fines de semana.

A mi mejor amigo, Josafat Ogarrio Elizalde, por aportar a mi formación desde la preparatoria y acompañarme a lo largo de todo el camino hasta hoy.

A mis compañeros de la universidad, Ángel David, Carolina, América, Daniela, Edgard, Diana, David y Sergio, por su compañía y consejos.

A mis amigos de la infancia, Jonathan, Diego, Joel y Alejandro, por ser mi segunda familia.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 5 |
| Resumen | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| DISCUSIÓN | 12 |
| 1. Organización del genoma del SARS-CoV-2 | 12 |
| 2. Estructura de la glicoproteína espiga (S) | 14 |
| 2.1. Dominio N-terminal | 19 |
| 2.2. Dominio de unión a receptor | 20 |
| 2.3. Dominios C-terminal | 23 |
| 2.4. Estructura de S2 | 24 |
| 2.4.1. Estructura de HR1 y HR2 | 27 |
| 2.5 Sitio de escisión de furina de la proteína espiga | 27 |
| 3. Ingreso celular de SARS-CoV-2 | 28 |
| 4. Desarrollo de vacunas para COVID-19 | 31 |
| 4.1. Vacunas de subunidades de proteínas solubles | 38 |
| 4.2. Vacunas de DNA | 39 |
| 4.3. Vacunas de mRNA | 39 |
| CONCLUSIONES | 40 |
| REFERENCIAS | 43 |

Abreviaturas

6HB: haz de 6 hélices cortas

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2

APC: célula presentadora de antígeno

CD: dominio conector

CH: región helicoidal central

COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019

CoV: coronavirus

cryo-EM: criomicroscopía electrónica

cryo-ET: criotomografía electrónica

CT: cola citoplasmática

CTD: dominio C-terminal

EMDB: Electron Microscopy Data Bank

FP: péptido de fusión

FPPR: región proximal del péptido de fusión

gRNA: RNA genómico

HR1: heptada repetida 1

HR2: heptada repetida 2

LT: linfocito T

LB: linfocito B

MERS: síndrome respiratorio de Oriente Medio

NAb: anticuerpos neutralizantes

nNAb: anticuerpos no neutralizantes

nsp: proteínas no estructurales

NTD: dominio N-terminal

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: marco de lectura abierto

PDB: Protein Data Bank

RAS: sistema renina-angiotensina

RBD: dominio de unión a receptor

RBM: motivo de unión a receptor

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA

RNA: ácido ribonucleico

RTC: complejo replicasa-transcriptasa

sgRNA: RNA subgenómico

ssRNA: ácido ribonucleico monocatenario

SARS: síndrome agudo respiratorio severo

SARS-CoV-2: coronavirus causante de la enfermedad por coronavirus 2019

TM: dominio transmembranal

TMPRSS: proteasa transmembranal serina proteasa

UTR: región no traducida

Resumen

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el coronavirus SARS-CoV-2 generó una emergencia sanitaria desde su aparición a finales del 2019. Los coronavirus (CoV) son una familia amplia de virus, algunos responsables del síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Los síntomas típicos de COVID-19 son fiebre y tos, así como dificultad para respirar, entre otros.

En el presente trabajo se describe la estructura de la proteína espiga (S) del SARS-CoV-2, así como su función. El SARS-CoV-2 es un virus de RNA monocatenario con un tamaño de genoma de ~30 kb. La proteína viral de superficie espiga está incrustada en la bicapa lipídica del virus. La entrada del coronavirus en las células huésped está mediada por la glicoproteína espiga, la cual forma homotrímeros que sobresalen de la superficie viral. La proteína S se compone de dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1, conformada por un dominio N-terminal, un dominio de unión al receptor y dominios C-terminales, se une al receptor en la célula huésped. La subunidad S2, conformada por el péptido de fusión, una región proximal al péptido de fusión, las heptadas repetidas 1 y 2, la hélice central, el dominio conector, el dominio transmembranal y la cola citoplasmática, fusiona la membrana viral y la célula huésped. Los glicanos ligados al N-terminal son fundamentales para el plegamiento adecuado y la neutralización de anticuerpos.

Para el ingreso de SARS-CoV-2 a las células huésped, el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la célula huésped reconoce al virus través de la subunidad S1. Por lo tanto, neutralizar la proteína espiga con anticuerpos preformados inducidos por una vacuna, terminaría la infección.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el coronavirus SARS-CoV-2 generó una emergencia sanitaria global inmediata desde su aparición en el último mes del año 2019. El 11 de marzo de 2020 se declaró una pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El 6 de abril de 2020, se reportaron más de 1.2 millones de casos confirmados de COVID-19 y 67 000 muertes en 209 regiones del mundo según datos de la OMS. La población mundial, así como los sistemas de salud, alimentarios y económicos sufrieron las consecuencias de la pandemia, causando cambios en el estilo de vida y, en algunos casos, pérdidas humanas (Saxena, 2020).

Los coronavirus (CoV) son una familia amplia de virus; algunos son responsables de condiciones graves en el humano como el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Los síntomas típicos de COVID-19 son fiebre y tos, así como dificultad para respirar, entre otros. Los casos severos desembocan en neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda e incluso la muerte. El estudio del virus SARS-CoV-2 es indispensable para salvaguardar la seguridad de población humana. Entre los estudios enfocados al SARS-CoV-2 se incluye la determinación de su estructura tridimensional, la capacidad de transmisión, las consecuencias de la infección y la accesibilidad a las vacunas y medicamentos antivirales para el control de la enfermedad. Las recomendaciones sanitarias son de relevancia para disminuir la transmisión de la infección, como son la correcta limpieza de manos de manera

constante, el distanciamiento social en lugares cerrados y entrar en estado de cuarentena en caso de adquirir la enfermedad (Saxena, 2020).

El SARS-CoV-2 es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA (+)) con una longitud de aproximadamente 30 kilobases (kb) que pertenece al género *Coronavirus* y a la familia *Coronaviridae* (Zhang *et al.* 2021). El sentido positivo del genoma significa que los ribosomas de la célula huésped pueden traducirlo directamente como un RNA mensajero funcional (mRNA) para sintetizar las proteínas virales inmediatamente después de la penetración en la célula (Jalali *et al.* 2022). La estructura del SARS-CoV-2 determinada por microscopía electrónica reveló que el tamaño de partícula del virus oscila entre 70 y 90 nm (Saxena, 2020). La proteína viral de superficie denominada espiga, la membrana y la envoltura del coronavirus están incrustados en la bicapa lipídica derivada de la membrana del huésped que encapsula la nucleocápside helicoidal que contiene el RNA viral (Figura 1) (Saxena, 2020; Zhang *et al.* 2021).

Conocer la estructura de los componentes del SARS-CoV-2 y la manera en la que estos participan en el proceso de infección es de vital importancia para el desarrollo de medicamentos y vacunas contra el virus. Se ha resuelto la estructura de la proteína espiga (S), la cual se encuentra en la superficie viral y es un blanco relevante para el desarrollo de diagnósticos, tratamientos y vacunas. Desde el inicio de la pandemia ha habido un gran progreso en la biología estructural de la proteína S de SARS-CoV-2, lo que ha mejorado el conocimiento sobre el proceso del ingreso del virus al organismo (Zhang *et al.* 2021).

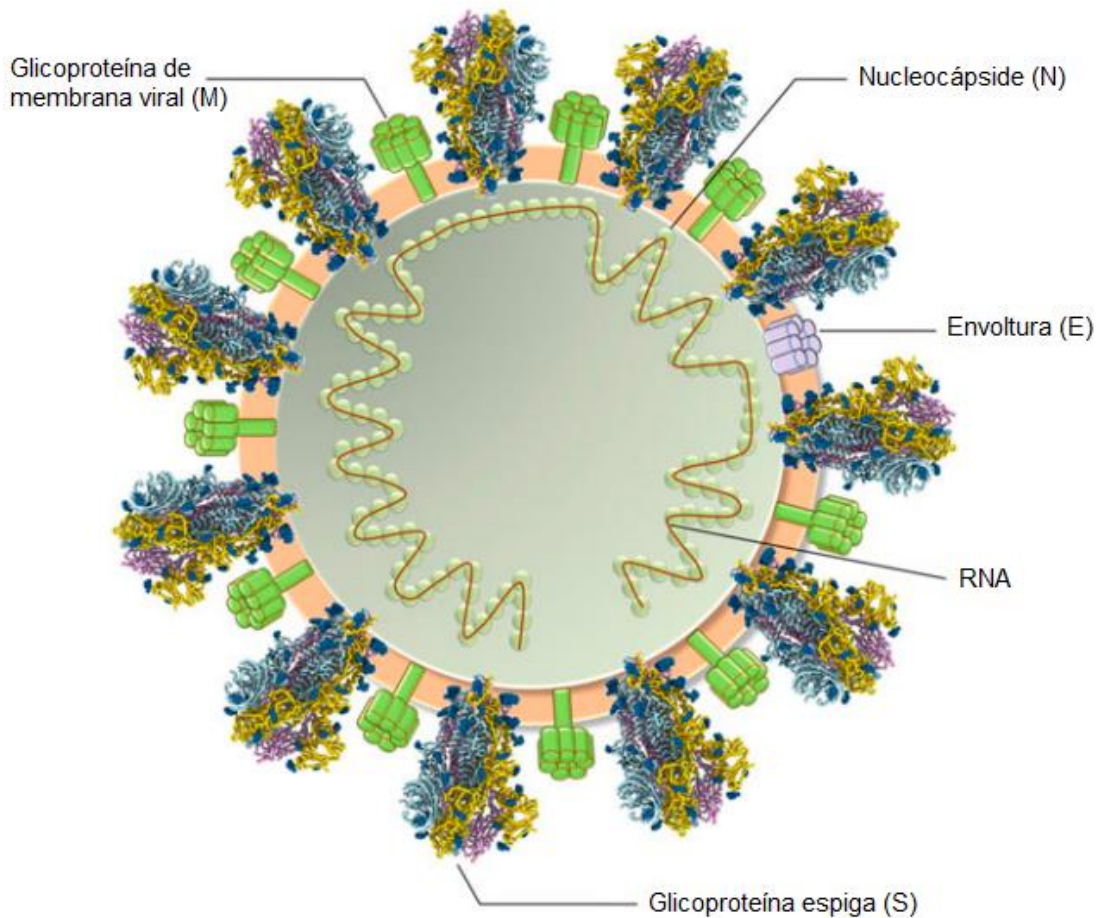


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 tiene proteínas virales de superficie: glicoproteína espiga (S), glicoproteína de membrana viral (M) y la envoltura (E) del SARS-CoV-2. Estas proteínas están incrustadas en la bicapa lipídica que encapsula la nucleocápside (N) que contiene el RNA viral (Saxena, 2020).

Este trabajo pretende brindar una descripción y un análisis de la estructura y la función de la proteína espiga (S) del SARS-CoV-2 y su importancia para la elaboración de vacunas.

DISCUSIÓN

1. Organización del genoma del SARS-CoV-2

Los CoVs tienen una organización del genoma muy conservada. Hay tres regiones genómicas principales: una que contiene el gen de la replicasa, otra que contiene los genes que codifican las proteínas estructurales y una última que codifica para genes accesorios (Figura 2) (Rando *et al.* 2021). El gen de la replicasa abarca dos terceras partes del genoma y consiste en dos marcos de lectura abiertos (ORF1a y ORF1b) (Rando *et al.* 2021). Este polipéptido se traduce en 16 proteínas no estructurales (nsp) que constituyen dos grandes poliproteínas (pp1a y pp1ab) que contribuyen a la transcripción y replicación del genoma viral (Jalali *et al.* 2022). El tercio restante del genoma codifica a las proteínas estructurales espiga (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) (Rando *et al.* 2021). Cada gen accesorio y estructural tiene al inicio secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) de cada gen que pueden ser cruciales para su expresión (Jalali *et al.* 2022).

Posee un capuchón metilado (m^7GpppA_1) en el extremo 5'. Esta estructura es sintetizada por varias enzimas codificadas por el genoma del SARS-CoV-2 y es necesaria para la supervivencia y posterior replicación del RNA viral en la célula huésped. La secuencia líder y la región no traducida (UTR) en el extremo 5' contienen siete estructuras de tallo-asa que son esenciales para la transcripción y replicación del RNA (Jalali *et al.* 2022). La 3'UTR también involucra estructuras requeridas para regular etapas alternas de la síntesis y replicación del virus de RNA. Finalmente, hay una cola poli-A (~ 30-60 nucleótidos de largo) en el extremo 3' que brinda estabilidad al genoma viral. Las estructuras terminales 5' y 3' permiten que

el genoma de SARS-CoV-2 se utilice como RNA mensajero en la célula hospedera para traducir las poliproteínas de replicasa (Jalali *et al.* 2022).

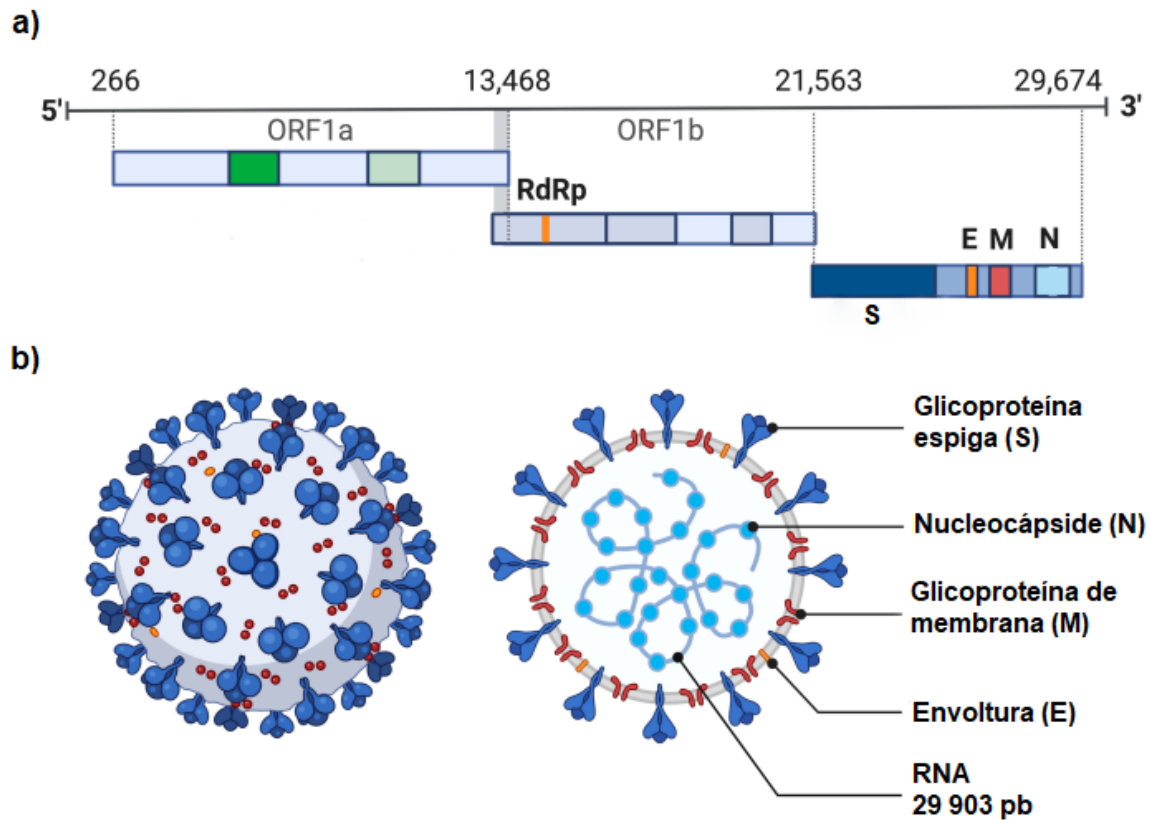


Figura 2. Estructura del genoma y del virus del SARS-CoV-2. a) La estructura genómica de los coronavirus está muy conservada e incluye tres regiones principales. Los marcos de lectura abiertos (ORF) 1a y 1b contienen dos polipéptidos que codifican las proteínas no estructurales (nsp). Las nsp incluyen enzimas como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). El último tercio del genoma codifica a las proteínas estructurales: las proteínas espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). b) La estructura física del virión del coronavirus, incluidos los componentes determinados por las proteínas estructurales conservadas S, E, M y N (Rando *et al.* 2021).

La proteína nucleocápside (N) forma la cápside para envolver el genoma, el cual se empaqueta aún más gracias a tres proteínas estructurales: proteína de membrana (M), proteína espiga (S) y proteína de envoltura (E) (Wang *et al.* 2020). Como miembro de la familia de los coronavirus, el tamaño del genoma del SARS-CoV-2 que se secuenció recientemente es de aproximadamente 29,9 kb. El SARS-CoV-2 contiene cuatro proteínas estructurales (S, E, M y N) y dieciséis proteínas no estructurales (nsp1-16) (Wang *et al.* 2020). La atención se ha centrado en la proteína S, que es una estructura involucrada en la entrada celular (Rando *et al.* 2021).

2. Estructura de la glicoproteína espiga (S)

La glicoproteína espiga del SARS-CoV-2 es una proteína de membrana tipo I, que forma un homotrímero anclado a la membrana viral por su dominio transmembranal, mientras que adorna la superficie del virus con su gran ectodominio (Zhang *et al.* 2021). La proteína está fuertemente glicosilada y cada protómero contiene 22 sitios de glicosilación unidos a asparagina (Figura 3) (Zhang *et al.* 2021). La proteína S de longitud completa de la cepa Wuhan-Hu-1 del brote inicial tiene 1273 residuos de aminoácidos (Zhang *et al.* 2021). La proteína S se compone de dos subunidades funcionales, S1 y S2. La subunidad S1 consta de un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión al receptor (RBD) y dominios C-terminales (CTD1 y CTD2) (Wang *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2021). La subunidad S1 se une al receptor en la célula huésped. La subunidad S2 contiene el péptido de fusión (FP), región proximal del péptido de fusión (FPPR), la heptada repetida 1 (HR1), la hélice central (CH), el dominio conector (CD), la heptada repetida 2 (HR2), el dominio transmembranal (TM) y la cola citoplásmica (CT) (Figura 3) (Zhang *et al.* 2021). La subunidad S2

fusiona las membranas del virus y la célula huésped. El sitio de corte en el límite entre las subunidades S1 y S2 se denomina sitio de escisión de la proteasa S1/S2. (Wang *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2021).

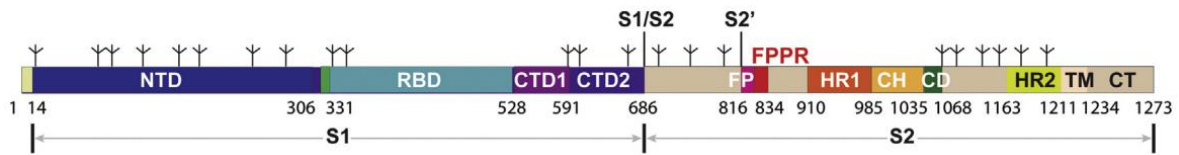


Figura 3. Representación esquemática de la organización de la proteína espiga del SARS-CoV-2. Los segmentos de S1 y S2 incluyen: NTD, dominio N-terminal; RBD, dominio de unión al receptor; CTD1, dominio C-terminal 1; CTD2, dominio C-terminal 2; S1/S2, sitio de escisión S1/S2; S2', sitio de escisión S2'; FP, péptido de fusión; FPPR, región proximal del péptido de fusión; HR1, heptada repetida 1; CH, región helicoidal central; CD, dominio conector; HR2, heptada repetida 2; TM, dominio transmembranal; CT, cola citoplasmática; y símbolos en forma de árbol para los glicanos (Zhang *et al.* 2021).

Para todos los coronavirus, las proteasas del huésped escinden la glicoproteína espiga en el sitio de escisión S2' para activar las proteínas, lo cual es fundamental para fusionar las membranas de los virus y la célula huésped a través de cambios conformacionales irreversibles. Los glicanos ligados al N-terminal son fundamentales para el plegamiento adecuado, la neutralización de anticuerpos y la decoración extensa de los trímeros de proteínas espiga (Wang *et al.* 2020).

En la conformación previa a la fusión de membranas (prefusión), las subunidades S1 y S2 permanecen unidas de forma no covalente. Para el ingreso del SARS-CoV-2 a las células huésped, el receptor de la enzima convertidora de

angiotensina 2 (ACE2) de la célula huésped reconoce al virus través del dominio de unión al receptor (RBD). En la conformación de prefusión, el fragmento S1 adopta una forma de 'V' con el NTD en un brazo y el RBD, CTD1 y CTD2 en el otro (Figura 4) (Zhang *et al.* 2021), que envuelven el haz helicoidal central formado por el fragmento S2 de prefusión, que proyecta el extremo N-terminal de HR1 hacia la membrana viral. Tres RBD forman el vértice del trímero S, presentando dos conformaciones distintas: un estado accesible al receptor "arriba" y un estado inaccesible al receptor "abajo" (Figura 5) (Zhang *et al.* 2021). Los tres NTD están ubicados en la periferia del trímero, cada uno de los cuales hace contacto con el RBD del protómero adyacente. Los CTD1 y CTD2 se empaquetan debajo del RBD contra S2 y entre los dos NTD vecinos, lo que indica que podrían modular estos dominios y desempeñar funciones importantes en los reordenamientos estructurales necesarios para la fusión de membranas (Wang *et al.* 2020).

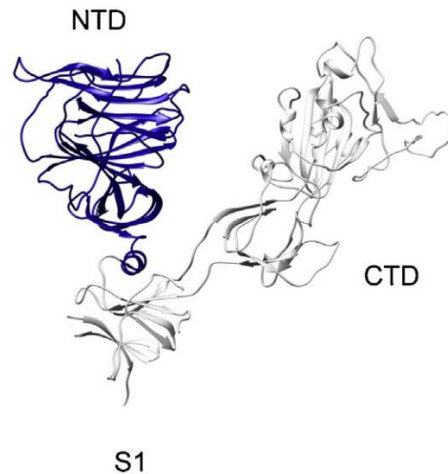


Figura 4. Estructura determinada por cryo-EM del fragmento S1 del trímero de la proteína S de SARS-CoV-2 de longitud completa (PDB 6XR8), con el NTD resaltado en azul y el resto de S1 en gris (Zhang *et al.* 2021).

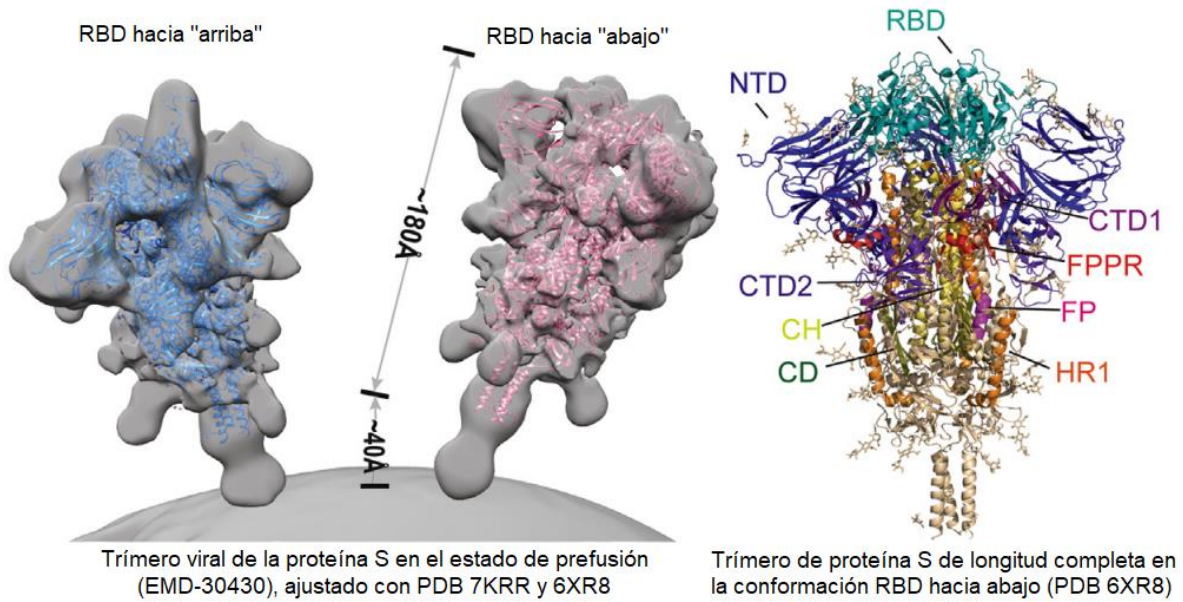


Figura 5. Distintos estados conformacionales de la proteína espiga del SARS-CoV-2. Izquierda: trímero viral de la proteína S de SARS-CoV-2 en la conformación de prefusión (EMD-30430), ajustado con las estructuras de proteínas purificadas (PDB 7KRR y 6XR8). Derecha: estructura cryo-EM del trímero S de longitud completa en la conformación RBD hacia abajo (PDB 6XR8) (Zhang *et al.* 2021).

En la conformación de postfusión, S1 se disocia como un monómero, mientras que S2 adopta una forma rígida simulando un bate de béisbol (220 Å de largo), y la HR1 se voltea para formar una hélice larga continua junto con la CH, que está más rodeada por hélices cortas y láminas β en el extremo distal de la membrana (Figura 6) (Zhang *et al.* 2021). El dominio del conector (CD), junto con un segmento (aminoácidos 718–729) en el fragmento S1/S2–S2', forman una hoja- β de tres hebras, y los aminoácidos 1127–1135 se unen al conector de hoja β para expandirla en cuatro hebras. Otro segmento (aminoácidos 737–769) en el fragmento S1/S2–S2' forma tres regiones helicoidales unidas por dos puentes

disulfuro que se empaquetan contra la ranura de la parte CH de la bobina enrollada para formar una estructura de haz de seis hélices cortas (6HB-1). La región N-terminal de la HR2 adopta una conformación helicoidal de una vuelta y también se empaqueta contra la ranura de la bobina enrollada HR1; la región C-terminal de la HR2 forma una hélice más larga que forma la segunda estructura de haz de seis hélices con el resto de la bobina enrollada de la HR1 (6HB-2) (Wang *et al.* 2020).

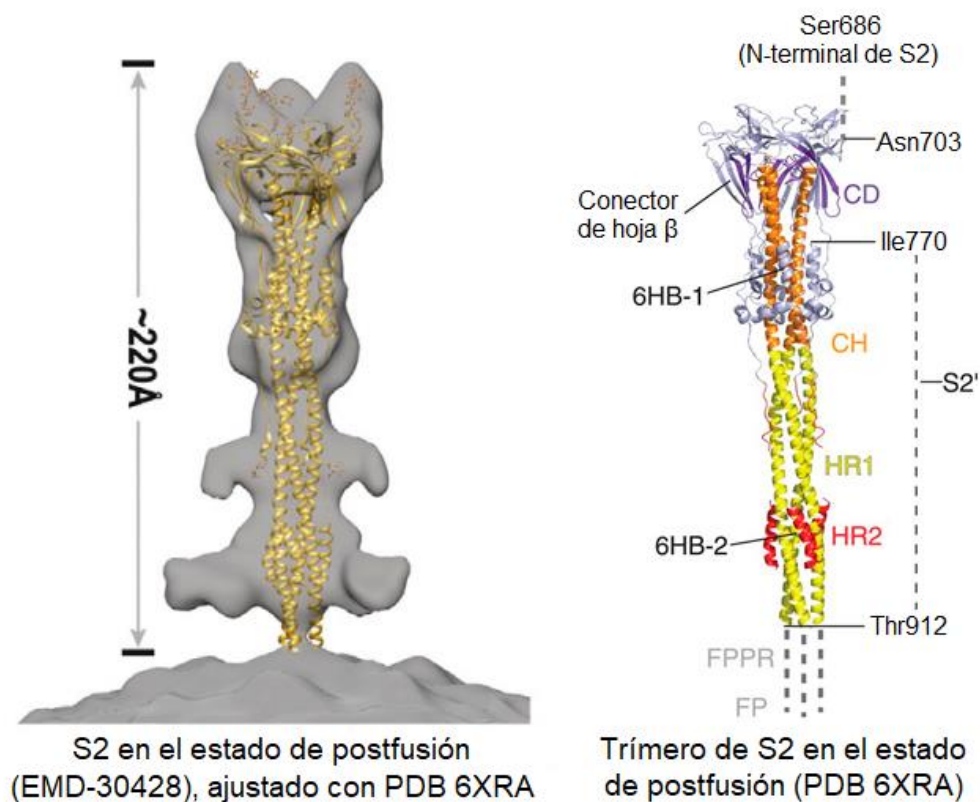


Figura 6. Estructura obtenida por cryo-EM de S2 en la conformación de postfusión. Izquierda: trímero S2 de SARS-CoV-2 en la conformación de postfusión (EMD30428), ajustado con la estructura de la proteína purificada (PDB 6XRA). Derecha: estructura cryo-EM del trímero S2 de longitud completa en la conformación de postfusión (PDB 6XRA) (Zhang *et al.* 2021).

2.1. Dominio N-terminal

En la periferia de la espiga (Figura 5), el dominio N-terminal (NTD) se proyecta alejándose del eje triple y se puede dividir en las regiones superior, central e inferior (Figura 7a) (Zhang *et al.* 2021). La estructura central tiene un pliegue β -sándwich antiparalelo formado por seis hebras de lámina- β y la otra con siete hebras. La región superior tiene dos cadenas β antiparalelas unidas por una pequeña asa, mientras que la región inferior consta de dos láminas- β cortas y una α -hélice. La estructura general del NTD posee 8 glicanos unidos a Asn (Zhang *et al.* 2021).

Se desconoce la función exacta del NTD en la proteína S del SARS-CoV-2, aunque se ha demostrado que los NTD de otros coronavirus reconocen carbohidratos en la unión inicial o receptores de proteínas específicos, o participan en la transición de prefusión a postfusión. No obstante, se han aislado anticuerpos neutralizantes (NAb) dirigidos contra NTD de pacientes infectados con SARS-CoV-2, lo que sugiere un papel funcionalmente crítico de este dominio (Zhang *et al.* 2021).

Se han determinado estructuras de alta resolución de la proteína S en complejo con anticuerpos neutralizantes (NAb) dirigidos contra NTD (4A8, FC05, CM25, 4-18, S2M28 y DH1205), lo que demuestra que estos anticuerpos se unen principalmente a dos superficies libres de glicano del dominio, regiones designadas como NTD-1 y NTD-2, respectivamente (Figura 7a) (Zhang *et al.* 2021). La mayoría de los anticuerpos se dirigen a la región NTD-1, que por lo tanto se denomina supersitio antigénico NTD-1. Está ubicado en el borde de la región central superior del NTD, incluidas cinco asas de superficie: N1 (aminoácidos 14 a 26), N2 (aminoácidos 67 a 79), N3 (aminoácidos 141 a 156), N4 (aminoácidos 177 a 186), N5 (aminoácidos

246 a 260) (Figura 7b), y una estructura de horquilla- β cerca de N3, rodeada por cuatro glicanos unidos a asparagina (Asn17, Asn74, Asn122 y Asn149). Estas asas se reconfiguran al unirse a varios anticuerpos (Figura 7b) (Zhang *et al.* 2021).

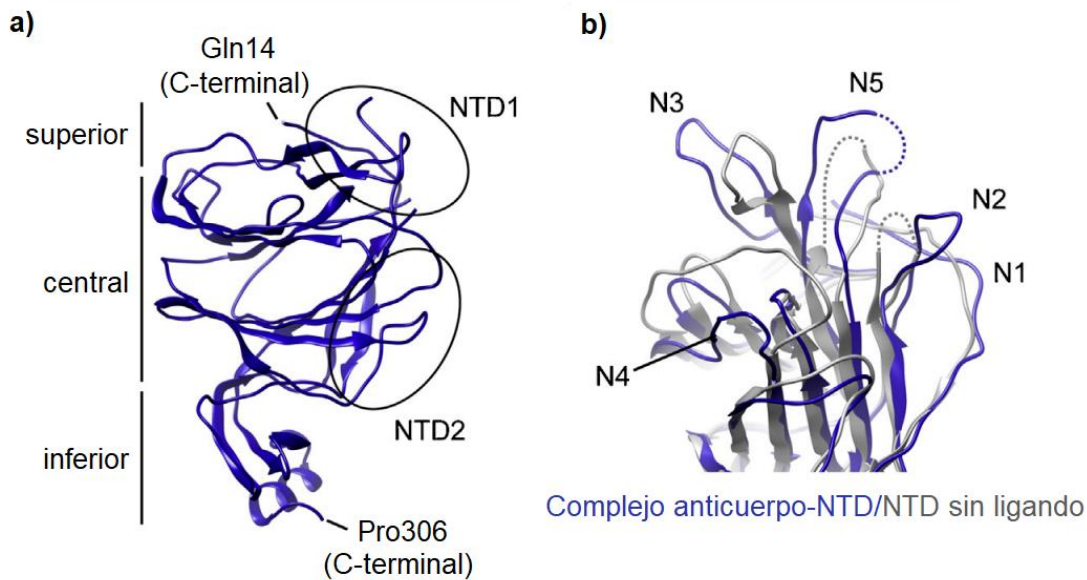


Figura 7. Estructuras de NTD y en complejo con anticuerpo. a) Vista de primer plano del NTD en la proteína S del SARS-CoV-2. b) El NTD (en azul) en complejo con 4A8 está superpuesto con el dominio completo del trímero S en gris, lo que muestra los cambios de las cinco asas de superficie (N1–N5) (Zhang *et al.* 2021).

2.2. Dominio de unión a receptor

El dominio de unión a receptor (RBD) contiene dos subdominios: una lámina- β antiparalela de cinco hebras conectada por hélices cortas y asas, y un asa extendida, denominada motivo de unión al receptor (RBM) (Lan *et al.* 2020). En la célula huésped, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) es un componente importante del sistema renina-angiotensina (RAS), encargada de la hidrólisis de angiotensina II a angiotensina 1-7. Las estructuras determinadas por cryo-EM de la

proteína S soluble no escindida en complejo con ACE2 monomérica muestran que el trímero S puede unirse a una, dos o tres ACE2 en las conformaciones “arriba” de RBD (Figura 8a) (Zhang *et al.* 2021). Una superficie exterior suavemente cóncava del RBM extendido interactúa con la hélice N-terminal del dominio de peptidasa (PD) similar a una garra de ACE2 (Figura 8b) (Zhang *et al.* 2021). Los puentes de hidrógeno y los puentes salinos entre una serie de aminoácidos polares, como K417, E484, N487 y N501 del RBD y D30, K31, H34, Y41 y K353 del ACE2, dominan la interacción RBD-ACE2 (Figura 7b) (Zhang *et al.* 2021). Las interacciones hidrofóbicas adicionales entre F486 de RBD y L79, M82 e Y83 de ACE2 también contribuyen a la unión del receptor (Figura 8b) (Zhang *et al.* 2021). Se han identificado mutaciones de los residuos clave, como N501Y, K417N y E484K, en las variantes preocupantes de rápida propagación, lo que conduce a una mayor afinidad por ACE2 y evasión inmunitaria (Zhang *et al.* 2021).

Un estudio realizado por Wrapp y colaboradores en 2020 obtuvo una estructura de resolución de 3.5 Å de un trímero de proteína S con un RBD en la conformación "arriba". La unión con ACE2 desestabiliza la estructura de prefusión, esto provoca que la subunidad S1 se disocie y que la subunidad S2 se repliegue en una conformación de postfusión estable. El RBD pasa por transiciones conformacionales como una bisagra, lo que conduce a la ocultación o exposición de los determinantes de la proteína espiga para acoplarse a un receptor de la célula huésped. Este proceso formará los siguientes dos estados: conformación "abajo" y conformación "arriba". En la conformación "abajo", el SARS-CoV-2 no pudo reconocer la ACE2 en las células huésped.

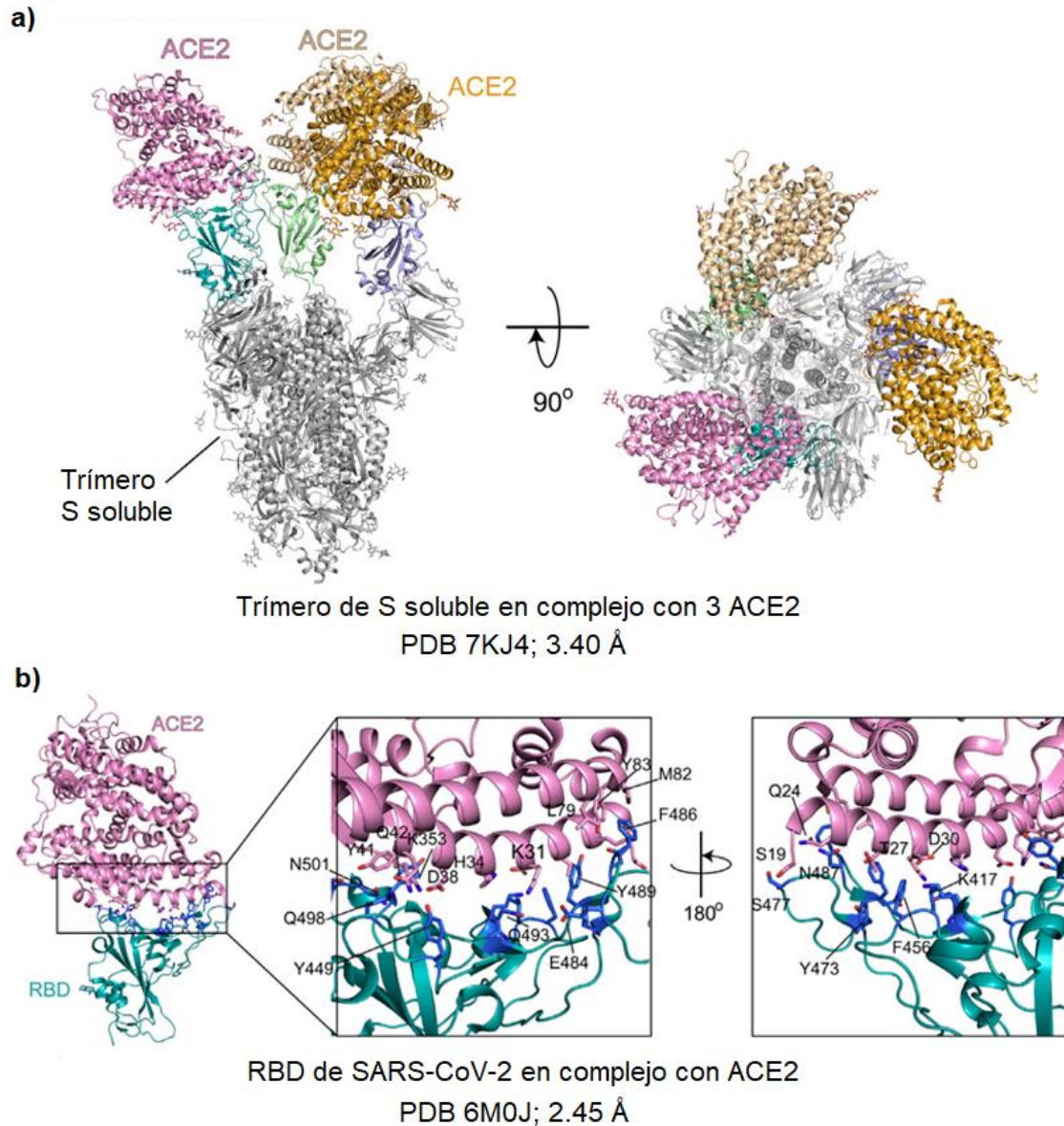


Figura 8. Estructuras de los complejos ACE2-S. a) La vista lateral (izquierda) y la vista superior (derecha) de la estructura cryo-EM del trímero S soluble en complejo con tres ACE2 (PDB 7KJ4). b) A la izquierda, la estructura cristalográfica del RBD de SARS-CoV-2 en complejo con ACE2 (PDB 6M0J), con ACE2 en rosa y RBD en cian. En medio y a la derecha, vistas en primer plano de la interfaz de unión con aminoácidos en contacto de la hélice N-terminal de ACE2 y el RBM del RBD mostrados en barras (Zhang *et al.* 2021).

El RBD es un objetivo dominante de los NAb provocados por una infección natural o por vacunación, lo que confirma su papel fundamental durante la infección (Zhang *et al.* 2021).

2.3. Dominios C-terminales

Los dominios C-terminales (CTD) están formados principalmente por láminas- β de segmentos de S1, así como el segmento N-terminal de S2 adyacente al sitio de escisión de furina (Figura 9) (Zhang *et al.* 2021). El CTD1 contiene dos láminas- β antiparalelas, con dos hebras y cuatro hebras, respectivamente. El CTD2 también tiene dos láminas- β : una de cuatro hebras y otra de cuatro hebras que incluye una hebra de la subunidad S2. En la conformación hacia abajo del RBD del trímero S, un elemento estructural en el CTD2, denominado "asa 630" (aminoácidos 620 a 640), se acomoda en la variante G614 mientras que se desordena en la cepa Wuhan-Hu-1. Cuando está estructurado, el asa 630 se inserta en un espacio entre el NTD y el CTD1 del mismo protómero, estabilizando la estructura del CTD2. También se encuentra en las proximidades del límite S1/S2, así como en la FPPR de un protómero vecino. La FPPR y el asa 630 ayudan a retener el RBD en la conformación hacia abajo, pero se mueven fuera de sus posiciones cuando el RBD adyacente se voltea hacia arriba. Por lo tanto, los CTD, junto con el FPPR y el asa 630 son componentes clave de la maquinaria de fusión S que modulan los reordenamientos estructurales fusogénicos de la proteína S (Zhang *et al.* 2021).

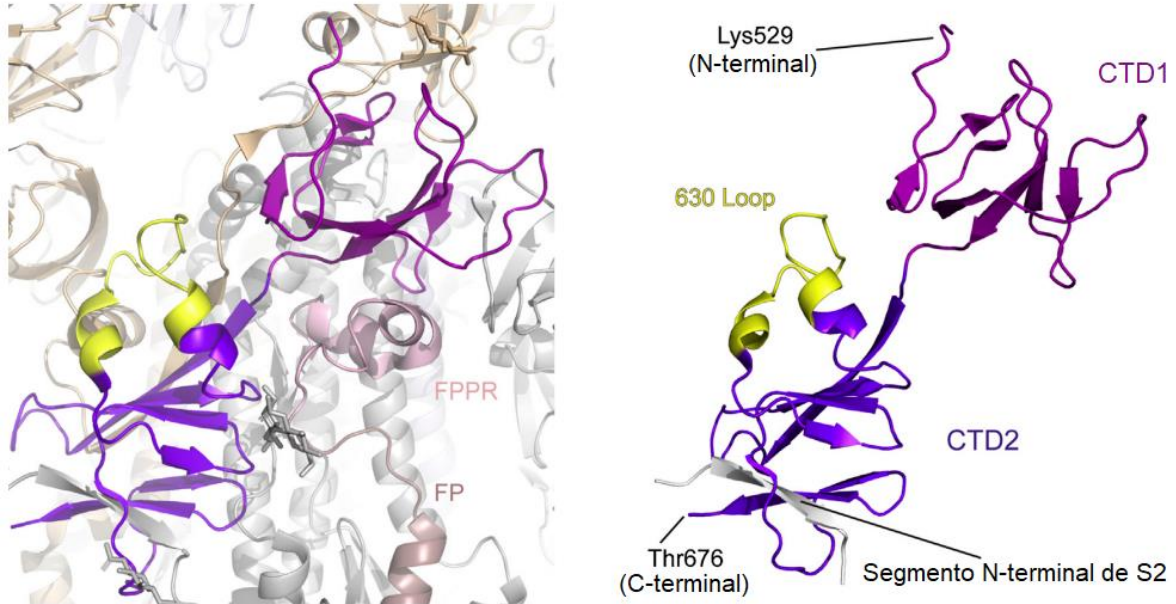


Figura 9. Estructuras de los CTD. Se muestran las estructuras de los CTD que forman el trímero S completo (PDB 7KRQ), con CTD1 en magenta, CTD2 en morado, la asa 630 en amarillo y la hebra β en el CTD2 de la subunidad S2 en gris (Zhang *et al.* 2021).

2.4. Estructura de S2

En la conformación de prefusión, tres subunidades de S2 se compactan alrededor de una bobina central enrollada de tres hebras de 140 Å de largo, formada por CH (Figura 5) (Zhang *et al.* 2021). Una porción de HR1 junto con otro segmento de S2 (aminoácidos 758 a 784) adoptan una conformación helicoidal y se ensamblan en un haz de nueve hélices con la bobina central enrollada, formando la parte más rígida de todo el trímero S. La región CD une CH y el C-terminal HR2 a través de una región enlazadora (Figura 10a) (Zhang *et al.* 2021). El FP forma una hélice corta y se mete en una cavidad formada por dos protómeros S vecinos. El FPPR estructurado choca con el CTD1 si el RBD se mueve hacia arriba y, por lo tanto,

parece ayudar a sujetar el trímero S de prefusión en la conformación cerrada con el RBD en conformación hacia abajo. También se ha sugerido que funciona como un dominio de cambio dependiente del pH que modula la posición de RBD. Los segmentos HR2, TM y CT restantes están desordenados en la mayoría de las estructuras del trímero S, por lo que muestran una densidad de baja resolución en las reconstrucciones cryo-ET que se pueden inclinar lejos del eje triple del trímero con un ángulo de 17° a 60° (Zhang *et al.* 2021).

En la conformación de postfusión, HR1 y CH forman una hélice α continua y tres copias de ellos se ensamblan en una bobina enrollada central larga de tres hebras de 180 Å (Figura 10a) (Zhang *et al.* 2021). Parte de HR2 se pliega en una hélice y se empaqueta contra el surco entre dos hélices HR1-CH para formar una estructura de haz de seis hélices, que recuerda la organización posterior a la fusión de otras proteínas de fusión viral como la glicoproteína transmembrana gp41 del virus de inmunodeficiencia humana. El CD permanece sin cambios desde la conformación de prefusión, como una lámina- β de tres hebras que cubre el extremo C-terminal de las hélices HR1-CH. La comparación de las conformaciones de prefusión y postfusión de la proteína S sugiere que HR1 sufre grandes reordenamientos para formar una bobina enrollada, translocando su extremo N-terminal una gran distancia para proyectar el FP hacia la membrana de la célula diana (Figura 10b) (Zhang *et al.* 2021). Además, el HR2 y el TM en su extremo C-terminal deben plegarse para empaquetarse a lo largo de la ranura de la bobina en espiral HR1-CH para formar el paquete de seis hélices de postfusión (Figura 10c) (Zhang *et al.* 2021). Estos eventos de replegamiento acercan de manera efectiva las membranas viral y de la

célula diana, lo que finalmente conduce a la fusión de la membrana (Figura 10d) (Zhang *et al.* 2021). Curiosamente, cinco glicanos N-ligados se ubican en la superficie de postfusión S2 a lo largo del eje largo con un espacio regular y pueden proteger el S2 de las respuestas inmunitarias del huésped (Zhang *et al.* 2021).

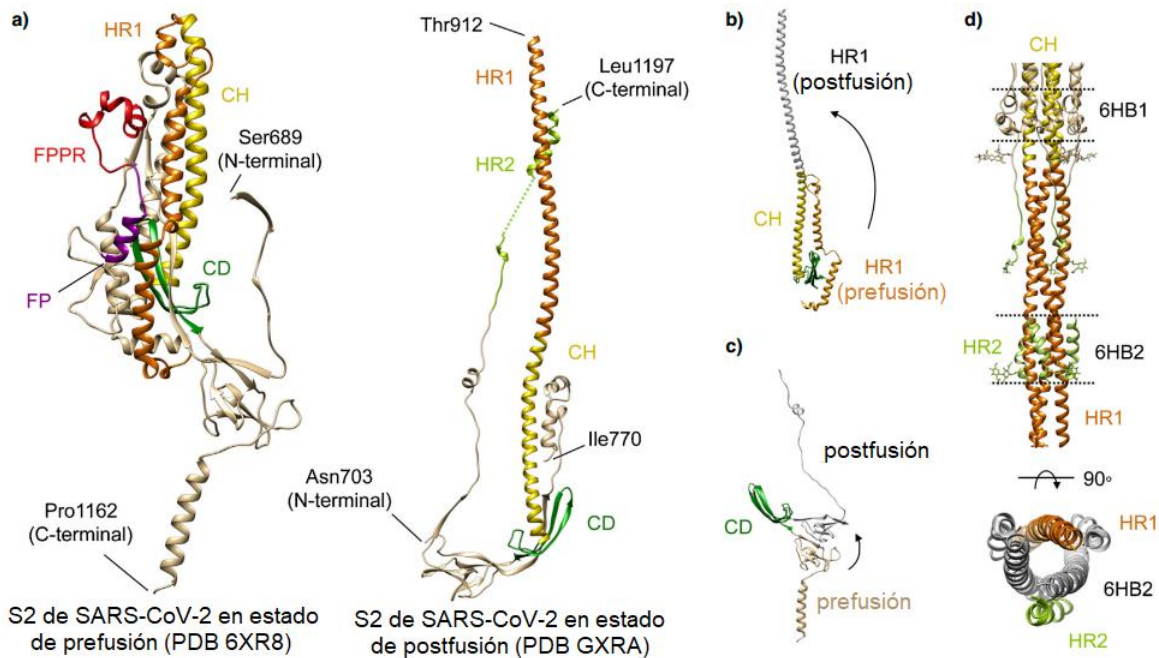


Figura 10. Estructuras y cambios conformacionales propuestos de la subunidad S2 de SARS-CoV-2. a) Vista de primer plano de S2 en las conformaciones de prefusión (izquierda) y postfusión (derecha) (PDB 6XR8 y 6XRA respectivamente) con el péptido de fusión (FP) resaltado en morado, el FPPR en rojo, hélice central (CH) en amarillo, dominio conector (CD) en verde, HR1 en naranja y HR2 en verde. b) Transición estructural propuesta del HR1 de la conformación de prefusión a postfusión. c) Cambio conformacional propuesto del HR2. d). Estructuras de haz de seis hélices en la postfusión de S2 con HR1 en naranja y HR2 en verde (Zhang *et al.* 2021).

2.4.1. HR1 y HR2

El haz de seis hélices (6HB) está formado por HR1 y HR2 y es fundamental para la fusión de membranas que está dominada por la proteína espiga de SARS-CoV-2, lo que convierte a HR1 y HR2 en un objetivo farmacológico atractivo. El complejo HR1-L6-HR2 contiene la mayor parte de los dominios HR1 y HR2 y un enlazador. Esta proteína de fusión exhibe una forma similar a una barra y es la estructura estándar de 6HB. Tres dominios HR1 se unen para formar un trímero de bobina espiral de manera paralela. Tres dominios HR2 están entrelazados alrededor del centro de la bobina enrollada de manera antiparalela que está mediada principalmente por interacciones hidrofóbicas. Los residuos hidrofóbicos en el dominio HR2 se unen con el surco hidrofóbico formado por cada dos hélices HR1 vecinas (Wang *et al.* 2020).

2.5. Sitio de escisión de furina de la proteína espiga

El límite S1/S2 de la proteína espiga del SARS-CoV-2 constituye el sitio de escisión para la proteasa furina de la célula huésped. Este sitio está constituido por 4 aminoácidos (P681, R682, R683 y A684) y se encuentra en el límite entre las subunidades S1 y S2. Funcionalmente, R682, R683, A684 y R685 constituyen el sitio de escisión de furina polibásico mínimo, RXYR, donde X o Y corresponde a una arginina o lisina cargada positivamente. Dichos sitios de división polibásicos no están presentes en el SARS-CoV y otros coronavirus relacionados que se encuentran en humanos, lo que puede contribuir a la alta virulencia del SARS-CoV-2 como resultado de que las furina proteasas requeridas para la activación

proteolítica de la proteína S se expresan de manera ubicua en humanos, proporcionando patogénesis y tropismo tisular expandido (Wang *et al.* 2020).

3. Ingreso celular de SARS-CoV-2

Los CoV ingresan a una célula huésped a través de la endocitosis, mediante la fusión de la bicapa lipídica de su envoltura con la membrana de la célula diana. La entrada celular se produce en tres pasos: unión, escisión y fusión. Primero, la proteína espiga se une a una célula huésped a través de un receptor o punto de entrada reconocido. Este reconocimiento se realiza por dominios en la subunidad S1. El SARS CoV-2 tiene una alta afinidad por la ACE2 humana, que se expresa en el epitelio vascular, otras células epiteliales y tejidos cardiovasculares y renales, entre otros. El proceso de unión está guiado por la estructura molecular de la proteína espiga. La subunidad S1 forma la cabeza de la corona y contiene el RBD, y la subunidad S2 forma el tallo que sostiene la cabeza. La subunidad S1 guía la unión del virus a la célula huésped y la subunidad S2 guía el proceso de fusión (Rando *et al.* 2021).

Después de la unión de la subunidad S1 a un punto de entrada (ACE2), la proteasa del huésped escinde la proteína espiga de los coronavirus en el límite S1/S2 en las subunidades S1 y S2. Este cebado proteolítico es importante porque prepara la proteína S para la fusión. Las dos subunidades permanecen unidas por las fuerzas de van der Waals, y la subunidad S1 estabiliza a la subunidad S2 durante todo el proceso de fusión de membranas. La escisión en un segundo sitio dentro de S2 (S2') activa a la proteína S para la fusión de membranas al inducir cambios conformacionales. Se ha demostrado que tanto la proteasa transmembranal serina

proteasa-2 (TMPRSS-2) como las catepsinas B/L median el cebado proteolítico de la proteína S del SARS-CoV-2, y la inhibición por moléculas pequeñas de estas enzimas inhibe completamente la entrada viral *in vitro* (Rando *et al.* 2021). Otras proteasas conocidas por cortar el límite S1/S2 en los coronavirus incluyen TMPRSS-4, las proteasas de serina (tripsina y furina), catepsinas y una proteasa similar a la tripsina de las vías respiratorias humanas (Rando *et al.* 2021). La respuesta inmunitaria del lisosoma de la célula intenta digerir el endosoma que contiene al virus mediante la actividad enzimática, lo que da como resultado el desprendimiento y la liberación del RNA genómico viral (Figura 11) (Jalali *et al.* 2022).

Inmediatamente después del acceso del genoma viral al citosol del huésped, los genes de replicasa se traducen y se sintetizan dos poliproteínas denominadas pp1a (440-500 kDa) y pp1ab (740-810 kDa). Las proteasas del virus y del huésped escinden estas poliproteínas en nsps individuales para producir el complejo replicasa-transcriptasa (RTC). Las nsps de RTC tienen varias actividades catalíticas que preparan un ambiente apropiado para la síntesis de RNA (Jalali *et al.* 2022). La formación y función de RTC conduce a la síntesis de múltiples copias de RNA genómico y subgenómico a través de la transcripción discontinua. Los RNA subgenómicos (sgRNA) actúan como mRNA y se adhieren a los ribosomas de la célula huésped para traducir diversas proteínas accesorias y estructurales. La producción de RNA subgenómico y genómico está mediada por RNA de cadena negativa (RNA (-)) que son aproximadamente el 1% de sus equivalentes de sentido positivo. A partir de ahí, el virus puede propagarse a otras células (Figura 11) (Rando *et al.* 2021).

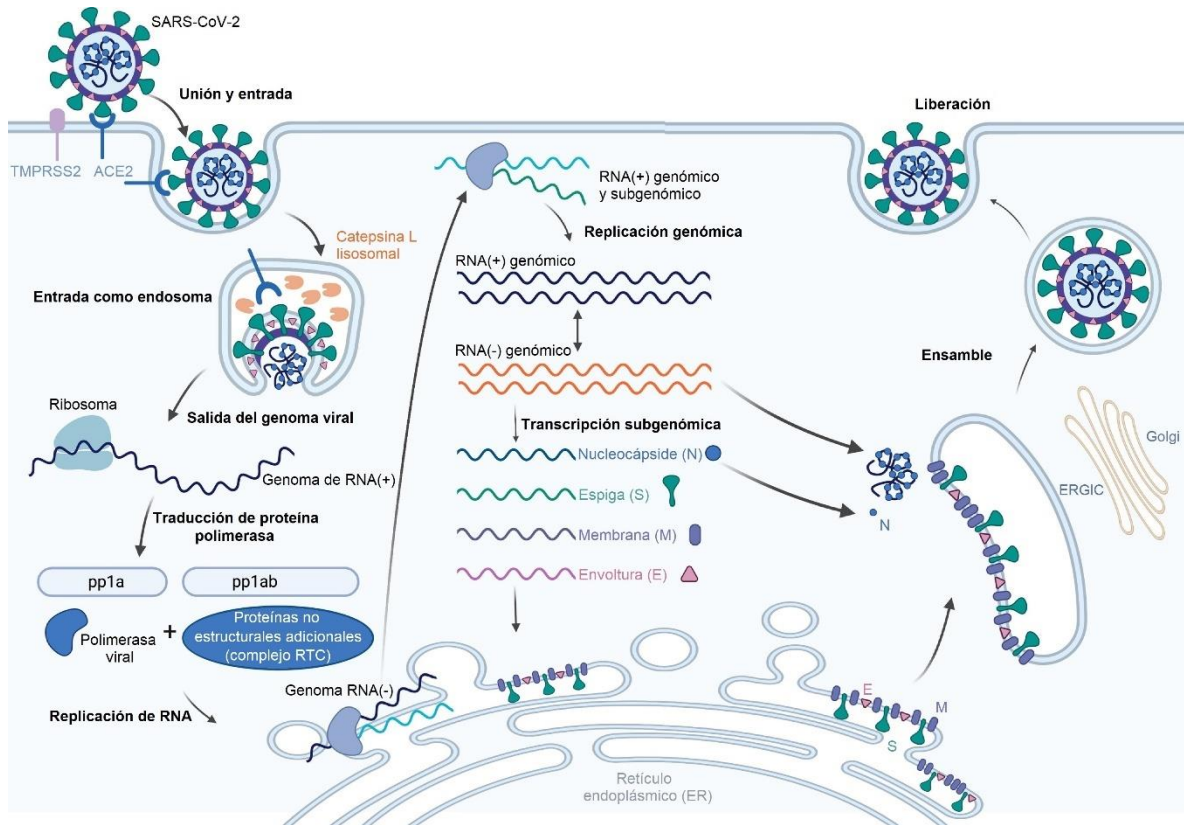


Figura 11. Entrada y replicación del SARS-CoV-2 en células huésped. El SARS-CoV-2 ingresa a la célula huésped a través de la unión de la proteína espiga (RBD/S1) al receptor ACE2. En el citosol, la traducción de ssRNA (+) por el ribosoma de la célula huésped conduce a la formación de las poliproteínas no estructurales pp1a y pp1ab, que son escindidas proteolíticamente por una proteasa codificada por el virus para formar el RTC. El resultado de la actividad del complejo es la formación de múltiples copias de gRNA y un conjunto de sgRNA. El sgRNA se traduce en proteínas estructurales y accesorias, que se ensamblan en partículas de virus en el lumen del ERGIC y finalmente abandonan la célula contaminada por exocitosis (Harrison *et al.* 2020).

Entre las proteínas estructurales, solo la proteína N es traducida por los ribosomas citosólicos libres de las células huésped. Las proteínas accesorias y estructurales asociadas a la membrana (S, M y E) son sintetizadas por los ribosomas unidos al retículo endoplásmico. Estas proteínas convergen en el compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC), donde la proteína M conduce la mayoría de las interacciones proteína-proteína esenciales para la formación de viriones. Para ello, la proteína M requiere del acompañamiento y participación de la proteína E, así como de la interacción con la proteína N. Finalmente, los genomas virales encapsulados brotan en la membrana ERGIC para formar viriones maduros. Luego, las partículas virales de la progenie se transfieren a la superficie celular a través de vesículas secretoras y se fusionan con la membrana plasmática, donde son exocitadas, secretadas y diseminadas a otras partes del cuerpo (Figura 11) (Jalali *et al.* 2022).

En el SARS-CoV-2, también se cree que la inserción del sitio de unión similar a la furina cerca del límite S1/S2 aumenta la adhesión célula-célula, lo que hace posible que el genoma viral se propague directamente de una célula a otra en lugar de tener que propagar el propio virión. De esta forma, el genoma del SARS-CoV-2 permite conocer el comportamiento patogénico del virus (Rando *et al.* 2021).

4. Desarrollo de vacunas para COVID-19

Las proteínas como unidades funcionales de la célula representan un sitio principal de acción farmacológica y xenobiótica. Por lo tanto, caracterizar a las proteínas objetivo es fundamental para conocer el mecanismo de acción de los fármacos y de los xenobióticos. Comprender cómo los diferentes aminoácidos interactúan con los

ligandos, proteínas y/o fármacos es crucial para explicar la conformación y la afinidad de estas interacciones (Lam-Cabanillas *et al.* 2021).

El acceso a vacunas eficientes y seguras es fundamental para poner fin a la pandemia de COVID-19 (Jalali *et al.* 2022). Una vacuna tiene como objetivo estimular la propia respuesta inmunitaria protectora del cuerpo, principalmente a los linfocitos B productores de anticuerpos y a los linfocitos T (como los citotóxicos) para que, en caso de un encuentro futuro con el patógeno viral específico, el sistema inmunológico pueda reconocer rápidamente el virus, entrar en acción, eliminar el agente viral, prevenir la propagación de la infección y evitar la enfermedad (Samaranayake *et al.* 2022). Generalmente, las vacunas vienen en una variedad de formas: pueden ser virus inactivados o atenuados, DNA o RNA, proteínas solubles y vectores virales recombinantes (Figura 12) (Jalali *et al.* 2022). Las partículas de las vacunas de virus inactivados han perdido su patogenicidad y no muestran riesgo de enfermedad en individuos inmunocomprometidos, sin embargo, pueden producir cantidades más bajas de anticuerpos específicos al antígeno y, por lo tanto, requieren vacunas de refuerzo para la eficacia y protección de las vacunas. Las vacunas basadas en vectores virales utilizan vectores de vacunas para expresar antígenos y transferirlos a las células huésped. El vector de la vacuna neutraliza el antígeno antes de entregarlo, lo que puede reducir la eficacia de la vacuna. Las vacunas de DNA proporcionan la transcripción de un antígeno y un adyuvante que puede imitar una infección, como los virus atenuados. La ventaja de las vacunas de DNA es que tienen estabilidad térmica con la inducción de respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células, sin embargo, pueden no ser efectivas al inducir

inmunidad citotóxica y humoral débil. También pueden activar oncogenes y aumentar el riesgo de cáncer al involucrar la integración del DNA viral en el genoma del huésped. Para las vacunas de RNA se utilizan tecnologías similares excluyendo el riesgo de integración en el genoma del huésped. Además, pueden provocar la expresión de antígenos que pueden modelar la infección con un virus activo. Los virus generados de RNA pueden tener una estructura menos estable en comparación con los virus de DNA, provocando reactogenicidad (reacciones locales y sistémicas) o una respuesta inflamatoria en la vacunación (Gediz Erturk *et al.* 2021).

La Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong, Hong Kong, informó una alta similitud genética entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2. Esta similitud genética llevó a los investigadores a determinar datos experimentales para los epítomos de linfocitos T y linfocitos B del SARS-CoV-1 derivados de las proteínas S y N que se mapean de manera idéntica al SARS-CoV-2. En comparación con las proteínas no estructurales, se ha informado que la respuesta de linfocitos T contra las proteínas estructurales es la más inmunogénica en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con SARS-CoV en recuperación. Además, se ha informado que las respuestas de los linfocitos T contra las proteínas S y N son las más dominantes y duraderas (Saxena, 2020).

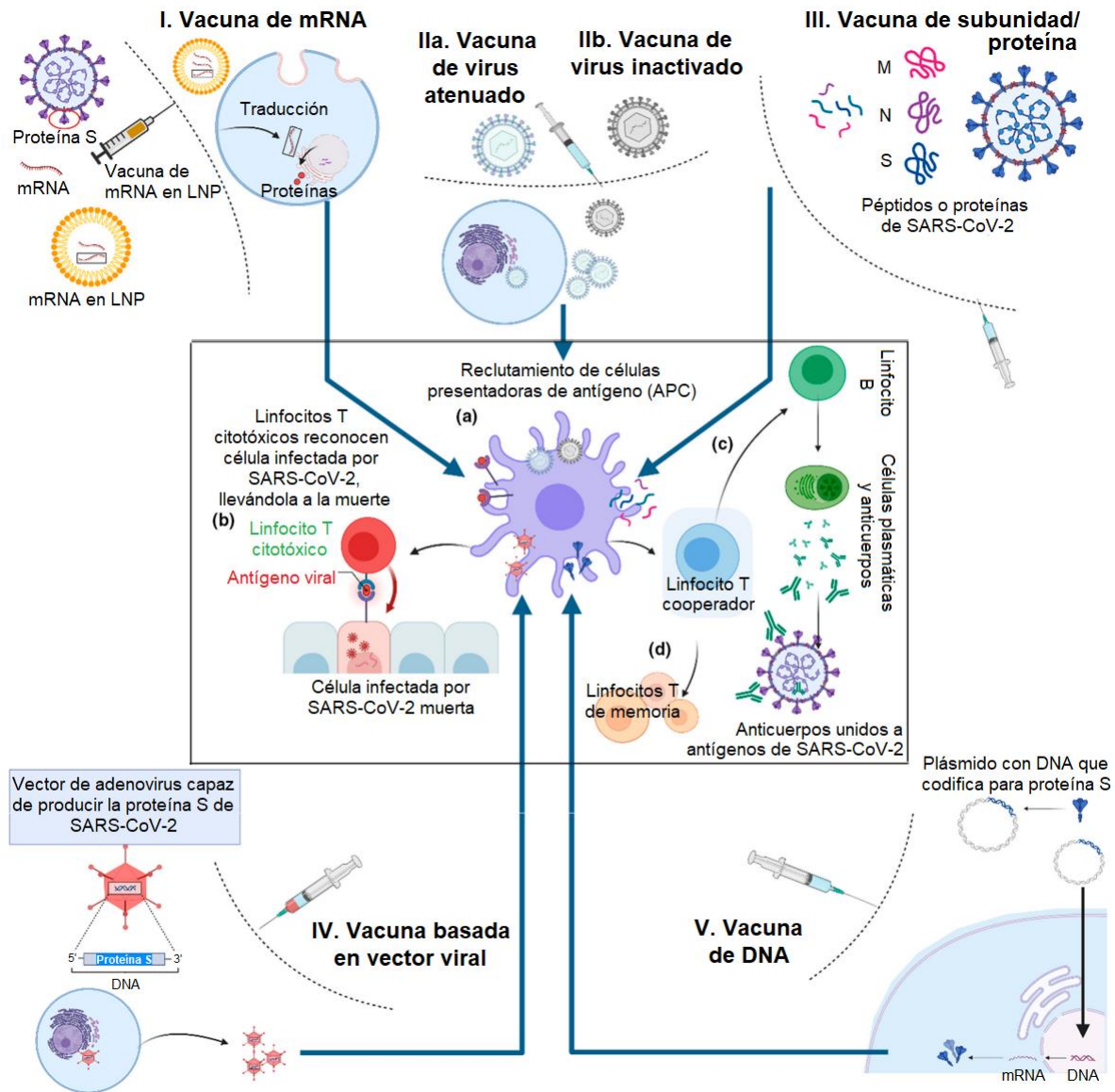


Figura 12. Mecanismos de actividad de 5 diferentes vacunas para la COVID-19. El cuadrado central delinea la respuesta inmune sistémica evocada por los antígenos de la proteína S del SARS-CoV-2 producidos por las vacunas. (a) Células presentadoras de antígeno (APC: células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y células de Langerhans (morado)) engullen los antígenos de la proteína S producidos y muestran porciones de ellos en sus superficies celulares para activar y reclutar linfocitos T (LT). (b) Los LT reclutados, las llamados LT citotóxicos (rojos) destruyen

las células infectadas con SARS-CoV-2. (c) APC también recluta linfocitos B (LB) (verde) que producen anticuerpos neutralizantes contra la proteína S, evitando la unión entre el virus y la célula huésped. (d) Las células de memoria de larga duración (marrón claro) se producen simultáneamente y pueden patrullar el cuerpo en busca de virus entrantes durante meses/años y reactivar una respuesta idéntica de LB y LT, descrita anteriormente. I: Vacunas de mRNA: contiene mRNA de la proteína S de SARS-CoV-2 dentro de partículas lipídicas que una vez inyectadas, son “ingeridas” por las APC para producir la respuesta inmune descrita. IIa y IIb: vacunas atenuadas e inactivadas; La vacuna que contiene el SARS-CoV-2 inactivado o atenuado se administra, las partículas virales no infecciosas son ingeridas por las APC para producir la respuesta inmune. III: Vacunas de subunidad de proteína de SARS-CoV-2: La vacuna que contiene los antígenos de proteína N, M y S del virus se administra y los antígenos no infecciosos son ingeridos por las APC para producir la respuesta inmune. IV: Vacunas recombinantes basadas en vectores virales: un virus no infeccioso, como un adenovirus, diseñado para combinarse con el DNA (recombinante) de la proteína espiga del SARS-CoV-2 se usa como vector en la vacuna. Una vez inyectados, los adenovirus no infecciosos se multiplican en las células huésped, se reconocen como extraños y son ingeridos por las APC para producir la respuesta inmune; V: vacunas de DNA: contienen fragmentos de DNA llamados plásmidos que se encuentran en las bacterias para codificar antígenos como la proteína S del SARS-CoV-2. Los plásmidos una vez ingeridos por APC se integran en su núcleo para producir la respuesta inmune (Samaranayake *et al.* 2022).

Ahora está bien establecido que los numerosos picos en la superficie viral inician su unión a las células humanas susceptibles a través del RBD, lo que le permite ingresar a la célula y producir una progenie que infectará a otras células y así propagar la infección. Por lo tanto, neutralizar la funcionalidad crítica de la proteína espiga con los anticuerpos preformados inducidos por la vacuna termina la infección (Samaranayake *et al.* 2022). Sin embargo, durante un periodo prolongado posterior a la vacunación, es probable que el nivel de anticuerpos neutralizantes del virus disminuya a niveles casi indetectables. En un encuentro posterior con el virus, los linfocitos T de "memoria" inducidos por la vacuna, así como los linfocitos B, entran en acción (Figura 12) (Samaranayake *et al.* 2022).

Los anticuerpos producidos por los linfocitos B a través de la vacunación pueden variar tanto en cantidad como en calidad. En general, los anticuerpos se pueden dividir en dos: anticuerpos neutralizantes (NAb) y no neutralizantes (nNAb). Los nNAb se unen al patógeno, pero no necesariamente interfieren con la entrada viral en las células huésped, posiblemente porque no interactúan con la región estructural correcta del virus para neutralizarlo. Sin embargo, contribuyen a la señalización de la invasión viral, después de lo cual el virus es procesado y destruido por las células inmunitarias reclutadas (Samaranayake *et al.* 2022). Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes (NAb) pueden neutralizar el virus por sí solos sin la ayuda de otras células inmunes. Por ejemplo, en el caso de la COVID-19, los NAb se unen a los antígenos de la proteína espiga en la superficie viral y evitan la unión con la célula huésped, como se muestra en la Figura 12. Las vacunas

aprobadas para la COVID-19 son extremadamente efectivas en la producción de NAb (Samaranayake *et al.* 2022).

El dominio N-terminal genera NAb en la célula huésped, haciendo de este un sitio antigénico relevante para la producción de anticuerpos. De igual manera, el dominio de unión a receptor (RBD) genera NAb que pueden reconocer múltiples epítomos distintos, mostrando grandes potencias en los ensayos de neutralización *in vitro* (Figura 13) (Zhang *et al.* 2021). Los NAb que se dirigen al sitio de unión de la ACE2, como REGN10933, C144 y S2H14 (anticuerpos neutralizantes generados a partir de ratones humanizados y pacientes convalecientes contra la proteína espiga del SARS-CoV-2), compiten directamente por la asociación de ACE2 (Zhang *et al.* 2021). Otros NAb reconocen un sitio diferente al de unión con ACE2, como REGN10987 y C135, los cuales probablemente evitan la unión de ACE2 al chocar con ACE2 o al bloquear la transición del RBD de la conformación “abajo” hacia “arriba” (Zhang *et al.* 2021).

Debido a la cantidad de determinantes antigénicos capaces de generar NAb contra la proteína espiga del SARS-CoV-2, se han desarrollado distintas vacunas con la finalidad de prevenir la infección por este virus. A continuación, se presentan algunos ejemplos de las vacunas desarrolladas y aprobadas para su uso de emergencia alrededor del mundo.

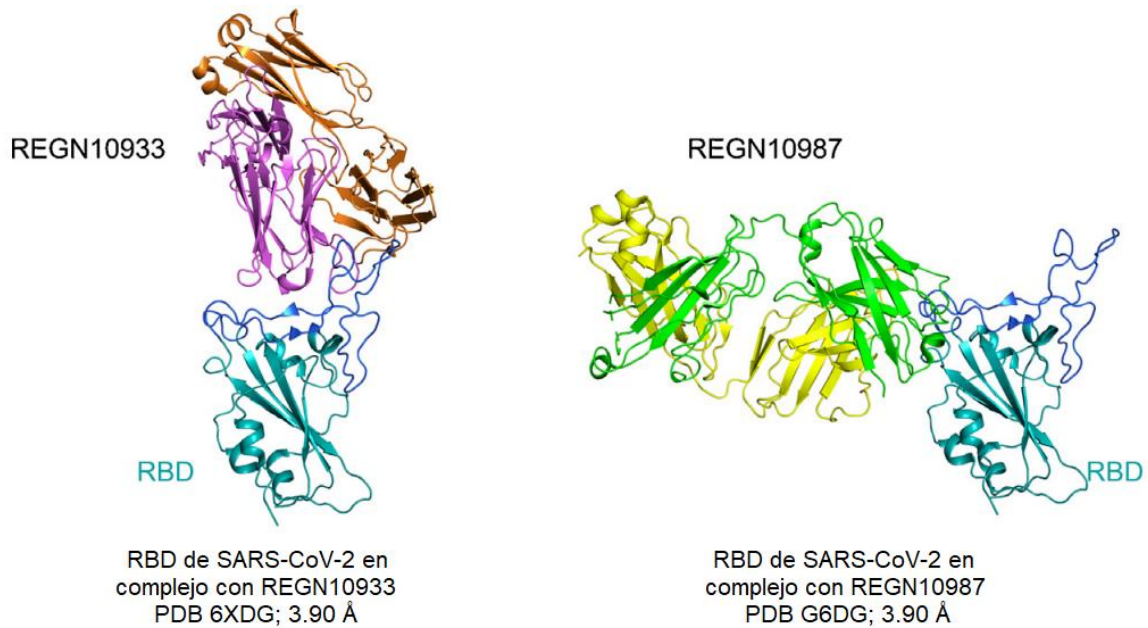


Figura 13. Complejos de RBD con anticuerpos. A la izquierda se presenta la estructura cryo-EM del RBD en complejo con el anticuerpo REGN10933 (PDB 6XDG). A la derecha se encuentra la estructura cryo-EM del RBD en complejo con el anticuerpo REGN10987 (PDB 6XDG). El RBD se muestra en cian y las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos en varios colores. El RBM está resaltado en azul oscuro (Zhang *et al.* 2021).

4.1. Vacunas de subunidades de proteínas solubles

El sistema inmunitario también puede estimularse introduciendo una o más proteínas o péptidos aislados del virus. Para ello, se utilizan antígenos aislados de la superficie de la partícula viral que son objetivos clave del sistema inmunitario (vacunas de subunidades de proteínas) (Rando *et al.* 2021).

NVX-CoV2373, también conocida como Nuvaxovid o Covovax, es una vacuna de subunidad de proteína para el SARS-CoV-2 producida por la empresa

estadounidense Novavax y sus socios. Nuvaxovid es una vacuna de nanopartículas de proteína construida a partir de una proteína espiga de SARS-CoV-2 de prefusión mutada en combinación con un adyuvante especializado a base de saponina para provocar una respuesta inmune contra el SARS-CoV-2. La proteína espiga se expresa de forma recombinante en células de insecto Sf9 y contiene mutaciones en el sitio de escisión de la furina (682-RRAR-685 a 682-QQAQ-685) junto con dos sustituciones de prolina (K986P y V987P) que estabilizan la proteína, incluida la mejora de la termoestabilidad (Rando *et al.* 2021).

4.2. Vacunas de vectores virales de DNA

Estas vacunas introducen un vector que contiene una secuencia de DNA que codifica antígenos seleccionados para inducir una respuesta inmunitaria específica (Rando *et al.* 2021).

La vacuna Gam-COVID-Vac, apodada Sputnik V, utiliza un enfoque de adenovirus recombinante heterólogo que usa adenovirus 26 (Ad26) y adenovirus 5 (Ad5) como vectores para la expresión de la proteína espiga del SARS-CoV-2. La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 está basada en un vector de adenovirus de chimpancé no replicativo, el cual expresa el gen de la proteína espiga del SARS-CoV-2 (Rando *et al.* 2021).

4.3. Vacunas de mRNA

Las vacunas de RNA están basadas en ácidos nucleicos que codifican para antígenos virales contra los cuales el cuerpo humano produce una respuesta inmunitaria humoral y celular. El mRNA se transcribe *in vitro* y se introduce en las

células a través de nanopartículas lipídicas (LNP) encargadas de proteger el mRNA de la degradación enzimática extracelular. El mRNA es reconocido por los ribosomas *in vivo* y luego se traduce en proteínas funcionales. Las proteínas virales intracelulares resultantes se muestran en las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de superficie, lo que provoca una fuerte respuesta de linfocitos T CD8+ (citotóxicos), así como respuestas de anticuerpos asociadas a linfocitos B y linfocitos T CD4+ (cooperadores) (Rando *et al.* 2021).

La vacuna BNT162b2 de Pfizer/BioNTech contiene la proteína espiga de SARS-CoV-2 anclada a la membrana y estabilizada por prefusión completa en una formulación de vacuna basada en tecnología de mRNA modificado (modRNA) (Rando *et al.* 2021).

La vacuna mRNA-1273 desarrollada por ModernaTX, está compuesta por un RNA encapsulado en LNP convencional que codifica una proteína S estabilizada por prefusión de longitud completa para SARS-CoV-2 (Rando *et al.* 2021).

CONCLUSIONES

Desde la aparición del virus SARS-CoV-2 en 2019, se ha logrado un gran progreso en el conocimiento de su biología estructural, en particular de su proteína espiga. Este conocimiento estructural ayuda a comprender el proceso de entrada viral, además de proporcionar una base sólida para el desarrollo y la optimización de vacunas y terapias contra la pandemia actual. La respuesta inmunitaria al SARS-CoV-2 se debe a su proteína espiga, que le permite ingresar a las células a través de la ACE2. Las células epiteliales también se han convertido en el principal objetivo

celular del virus, lo que explica los síntomas respiratorios que se observan con frecuencia en la COVID-19.

El SARS-CoV-2 es un virus de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA (+)) con una longitud de 29,9 kb. Posee tres regiones genómicas principales: una que contiene el gen de la replicasa, otra que contiene los genes que codifican proteínas estructurales y una última que codifica para genes accesorios. Las proteínas estructurales son espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N).

La glicoproteína espiga del SARS-CoV-2 es una glicoproteína transmembranal con una longitud de 1273 aminoácidos. La proteína S posee dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 se une al receptor en la célula huésped, mientras que la subunidad S2 fusiona las membranas del virus y la célula huésped. El sitio de corte en el límite entre las subunidades S1 y S2 se denomina sitio de escisión de la proteasa S1/S2.

Los coronavirus ingresan a una célula huésped a través de la fusión de la bicapa lipídica de su envoltura con la membrana de la célula diana. La entrada celular se produce en tres pasos: unión, escisión y fusión. Primero, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la célula huésped reconoce al virus través del dominio de unión al receptor (RBD) en la subunidad 1 de la proteína espiga. El RBD sufre cambios conformacionales como una bisagra, lo que conduce a la ocultación o exposición de los determinantes de la proteína espiga para acoplarse a un receptor de la célula huésped. Este proceso formará los siguientes dos

estados: conformación "abajo" y conformación "arriba". En la conformación "abajo", el SARS-CoV-2 no reconoce la ACE2 en las células huésped.

Después de la unión de la subunidad S1 a la ACE2, la proteasa del huésped, como la proteasa transmembranal serina proteasa-2 (TMPRSS-2) o las catepsinas B/L, escinde la proteína espiga de los coronavirus en el límite S1/S2 en las subunidades S1 y S2. Este corte prepara a la proteína S para la fusión. Las dos subunidades permanecen unidas por interacciones no covalentes, y la subunidad S1 estabiliza a la subunidad S2 durante todo el proceso de fusión de membranas. La escisión en un segundo sitio dentro de S2 (S2') activa a la proteína S para la fusión de membranas al inducir cambios conformacionales, acercando de manera efectiva las membranas viral y de la célula diana, lo que finalmente conduce a la fusión de la membrana.

El genoma viral ingresa al citosol del huésped, los genes de replicasa se traducen y se sintetizan dos poliproteínas, pp1a y pp1ab. Las proteasas del virus y del huésped escinden estas poliproteínas y se produce el complejo replicasa-transcriptasa (RTC). Esto conduce a la síntesis de múltiples copias de RNA genómico y subgenómico. Los sgRNA actúan como mRNA y se adhieren a los ribosomas de la célula huésped para traducir diversas proteínas accesorias y estructurales. Las proteínas accesorias y estructurales son sintetizadas por los ribosomas y se forman viriones maduros. Luego, las partículas virales salen de la célula por exocitosis y son diseminadas a otras partes del cuerpo.

Dado que las proteínas son un sitio principal de acción farmacológica y xenobiótica, comprender cómo los diferentes aminoácidos interactúan con los

ligandos o proteínas es de vital importancia para explicar las interacciones, en este caso, entre la proteína espiga del SARS-CoV-2 y la ACE2 de las células huésped. Por lo tanto, neutralizar la proteína espiga evitaría la infección. Esto puede lograrse con la administración de vacunas que generen anticuerpos neutralizantes contra distintos epítomos de la proteína espiga, destacando al dominio de unión a receptor.

Las vacunas aprobadas para la COVID-19 generan NAb de manera exitosa. Entre ellas se encuentran la NVX-CoV2373, compuesta por subunidades de proteína espiga; Gam-COVID-Vac, que emplea vectores de virus recombinantes con DNA que codifica para la proteína espiga; y mRNA-1273, vacuna de mRNA que produce la proteína espiga.

Los avances en el estudio del SARS-CoV-2 han sido fundamentales para la prevención de la COVID-19, pues al conocer el genoma del virus, su estructura, la función de sus componentes y el mecanismo de infección, es posible el desarrollo de vacunas.

REFERENCIAS

1. Saxena, S. K. (Ed.). (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutics. *Springer nature*, pp 2, 3, 24, 25, 26, 27, 130, 131, 133.
2. Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current opinion in virology*, 50, 173-182.
3. Rando, H. M., MacLean, A. L., Lee, A. J., Lordan, R., Ray, S., Bansal, V., Greene, C. S. et al. (2021). Pathogenesis, symptomatology, and transmission

- of SARS-CoV-2 through analysis of viral genomics and structure. *Msystems*, 6(5), e00095-21.
4. Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 587269.
 5. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L et al.: Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020, 581:215-220
 6. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., et al. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Sci. (N. Y. N. Y.)* 367, 1260–1263.
 7. Jalali, A., & Khoramipour, M. (2022). SARS-CoV-2: Review of Structure, Genome, Genetic Variants, and Vaccines. *Journal of Genetic Resources*, 8(1), 16-34.
 8. Lam-Cabanillas, E., León-Risco, A., León-Risco, K., Llamó-Hoyos, G., López-Zavaleta, R., Luzuriaga-Tirado, E., Mendoza-Blaz, A. & Huamán-Saavedra, J. (2021). Bases moleculares de la patogénesis de Covid-19 y estudios *in silico* de posibles tratamientos farmacológicos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(2), 417-432.
 9. Gediz Erturk, A., Sahin, A., Bati Ay, E., Pelit, E., Bagdatli, E., Kulu, I., Gul, M., Mesci, S., Eryilmaz, S., Oba Ilter, S. & Yildirim, T. (2021). A multidisciplinary approach to coronavirus disease (COVID-19). *Molecules*, 26(12), 3526.

10. Samaranayake, L. P., Seneviratne, C. J., & Fakhruddin, K. S. (2022). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines: A concise review. *Oral diseases*, 28, 2326-2336.
11. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100-1115.