

TÍTULO: Investigación y cuantificación de anticuerpos anti-SARS-COV 2 mediante la tecnología “*in House-ELISA*” para uso clínico en SIPROSA - Ministerio de salud de Tucumán”.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este proyecto es desarrollar un test para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 mediante un inmunoensayo versátil y escalable a las diferentes regiones antigénicas del virus que el conocimiento científico detecte con el correr de las investigaciones. Este test será desarrollado totalmente a nivel local, con un costo de producción muy ventajoso respecto a los comerciales, permitiendo incrementar los testeos poblacionales. Además será de utilidad para cuantificar los anticuerpos presentes en suero de conlescientes para su posterior utilización terapéutica en COVID19.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Clonar y expresar en cultivos de células humanas HEK293T el dominio de unión a receptor (RBD, *Receptor Binding Domain*) de diferentes coronavirus, incluyendo SARS-CoV-2.
- Clonar y expresar en cultivos de células humanas HEK293T las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo monoclonal humano IgG anti SARS-CoV-2 (IgG monoclonal recombinante).
- Clonar y expresar en cultivos de células humanas HEK293T diferentes regiones antigénicas de SARS-CoV-2.
- Purificar el diferentes proteínas, en especial el dominio RBD de la proteína S de SARS-CoV-2 a partir del sobrenadante de cultivos de células humanas HEK293T transfectadas con correspondiente plásmidos correspondientes.
- Inmovilizar las proteínas de superficie de SARS-CoV-2 en una microplacas adecuadas y estudiar la sensibilidad de diferentes sistemas de revelado con muestras teóricas (IgG recombinante).
- Validar la sensibilidad, especificidad, adaptabilidad y robustez del sistema diagnóstico generado.

ANTECEDENTES

A fines de 2019 surgió en China un nuevo coronavirus (2019-nCoV) denominado SARS-CoV-2 dada su semejanza tanto estructural como la expresión clínica en humanos con el SARS-CoV-1 (229E [HCoV-229E])[1]. A pesar de drásticas medidas de contención, la propagación de este virus está amenazando con hacer colapsar los sistemas de salud de todo el mundo. Por este motivo, autoridades sanitarias internacionales se han centrado en el diagnóstico rápido y el aislamiento de los pacientes, así como en la búsqueda de terapias capaces de contrarrestar los efectos más graves de la enfermedad que constituyen aproximadamente el 15% de los casos [2]. Sin embargo, la falta de un tratamiento farmacológico específico dificulta la contención de la pandemia. En este contexto y a medida que el número de infectados incrementa de modo exponencial, se tornan estratégicos los métodos diagnósticos. Existen actualmente más de 50 pruebas para la detección del virus durante la enfermedad aguda[3]. Sin embargo, el desarrollo de ensayos serológicos se ha retrasado debido a la complejidad de la obtención de antígenos virales. Las pruebas serológicas son estratégicas para determinar la verdadera tasa de infección, así como la tasa de mortalidad por infección en una población determinada. Además, son útiles para caracterizar la respuesta inmune al virus de manera cualitativa y cuantitativa detallada, y son además de uso práctico inmediato como test de diagnóstico rápido. Se pueden usar para identificar personas que fueron infectadas (incluidos casos graves, leves y asintomáticos) y que son potencialmente inmunes. Un estudio reciente demostró que la infección con coronavirus que circulan en poblaciones humanas como HKU, NL63, etc., también induciría una inmunidad que

protege de la reinfección durante meses o años[4]. En este contexto, individuos que han desarrollado una respuesta inmune al SARS-CoV-2 son probablemente inmunes, y su suero/plasma puede servir como una valiosa opción terapéutica para pacientes con COVID-19 grave, especialmente en ausencia de otras opciones. Un ensayo serológico es fundamental para identificar posibles donantes. La técnica llamada ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es un método versátil, ampliamente utilizado y sensible. Por ello, en el actual contexto de pandemia, esta herramienta comenzó a utilizarse como estrategia para monitorear pacientes que tuvieron contacto con el SARS-CoV-2, así también como aquellos recuperados de COVID-19 para ser candidatos a potenciales donadores de plasma[5]. En nuestra provincia, se puso en marcha un Banco de Plasma el cual recibe donaciones de pacientes recuperados de COVID-19, una iniciativa fundamental para el trabajo mancomunado en pos de un alivio a la sociedad frente a la actual coyuntura. La cuantificación de las inmunoglobulinas anti SARS-CoV-2 en estos plasmas es esencial para asegurar la respuesta terapéutica.

La unión del SARS-CoV-2 a sus receptores celulares está mediada por la glicoproteína de superficie denominada “*Spike*” (S). El dominio de unión al receptor (RBD) de esta proteína S es uno de los dominios encargados de esta interacción y fusión del virus a la membrana celular[6]. Los anticuerpos capaces de unirse a la proteína S, y especialmente al dominio RBD, son capaces de neutralizar al virus[7]. Otras proteínas virales de la superficie del nuevo coronavirus incluyen la proteína del nucleocapside (N) y de membrana (M). Cabe resaltar que estas proteínas, en especial la glicoproteína S están altamente glicosiladas (como su nombre lo indica), y que estas glicosilaciones representan los epítopes más antigénicos. Por lo tanto, resulta esencial su expresión en sistemas celulares capaces de reproducir estas glicosilaciones para poder detectar con alta sensibilidad los anticuerpos buscados. Es por ello que estas proteínas deben ser expresadas en líneas celulares eucariotas, preferentemente humanas.

En el presente proyecto se utilizará el protocolo descrito por Stadlbauer y cols.[5], para desarrollar un ELISA que pueda ser fácilmente modificado y/o adaptado a las necesidades locales y abierto los constantes cambios de paradigma que los vertiginosos estudios de SARS-CoV-2 arrojan casi a diario.

METODOLOGIA

Transfección de células eucariotas y purificación de proteínas

Este protocolo se puede usar tanto para los vectores de expresión de RBD secretada como para la versión soluble trimérica de la proteína S de SARS-CoV-2. Los niveles de expresión del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S son altos (> 20 mg / l de cultivo) mientras que los niveles de expresión para la proteína completa son más bajos (aproximadamente 1 mg / ml). Por lo tanto, utilizamos el RBD recombinante para desarrollar el test ELISA.

Preparación de plásmidos: Los vectores de expresión disponibles se transformarán en *E. coli* utilizando kanamicina como antibiótico de selección. Posteriormente los mismos se expandirán creciendo las cepas transformadas en medio LB a 37° C O.N. Para llevar adelante el siguiente paso de transfección en células eucariotas es necesario ADN plasmídico de alta calidad y libre de endotoxinas, el cual se obtendrá utilizando kits de maxi o midi-prep endotoxin-free, disponibles en el mercado.

Expresión de Proteínas en Cultivos Celulares de HEK293T: Para obtener las proteínas del SARS-CoV-2 en el estado de glicosilación que más se asemeja al estado natural, se transfectarán los plásmidos correspondientes, libres de endotoxina, en una línea celular de riñón

embrionario humano (HEK293T). Esta línea celular inmortalizada se usa comúnmente para obtener grandes cantidades de proteína a partir de cultivos celulares. Se empleará PEI de 87 kDa como reactivo de transfección. Brevemente, se crecerán cultivos de HEK293T en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos/antimicótico (Penn/Strep/AnfoB) en una estufa gaseada a 37°C con 5% de CO₂. Al llegar a confluencia, se repicarán hacia 5 botellas T175 (T175 flasks). Cuando estas lleguen a 60% confluencia, se procederá a transfectarlas con los plásmidos correspondientes con PEI según recomendaciones y protocolo brindado del proveedor, y se empleará DMEM suplementado con 5% de SFB como medio de secreción. Al cabo de 24/36 horas post-transfección, se recogerá el medio de cultivo sobrenadante (aproximadamente 120 ml) que contendría las proteínas codificadas en los plásmidos, ya que fueron clonadas con la incorporación de una secuencia señal que las envía hacia el sistema secretorio celular.

Purificación de la proteína: El medio de cultivo resultante de la incubación con las células será centrifugado a 1000 RPM durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante será filtrado con una membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm y suplementado con 20 mM de imidazol y 1mM de PMSF. El sobrenadante será luego inyectado en una columna de cromatografía por afinidad His-Trap HP (GE Lifescience) acoplada a un sistema Äkta pure 25 l. La columna será lavada con 10 volúmenes de solución tampón fosfato pH 7,4 conteniendo 500 mM NaCl y 20 mM imidazol. La etapa de elución se llevará a cabo mediante un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna para ir desde 20 mM hasta 500 mM de imidazol. Las fracciones serán colectadas en tubos falcon de 15 ml. Las fracciones serán examinadas mediante geles de SDS-PAGE y aquellas conteniendo la proteína de interés serán dializadas contra un buffer fosfato 200 mM, pH 6,5. Se determinará la concentración proteica mediante Bradford y se guardaran alícuotas de 10 µg en freezer a -80 °C.

Factibilidad La disponibilidad de una plataforma de cultivos celulares, el equipamiento y *know-how* necesario para la purificación de proteínas recombinantes humanas disponible en IMMCA, así como la experiencia de los investigadores de CERELA en inmovilización, prototipado y los investigadores de SIPROSA en la validación de ensayos permitirán permitirán a nuestra provincia tener disponibilidad de estos test a demanda del sistema. Los científicos estiman que el primer prototipo del test estará disponible en las próximas semanas para que el Ministerio de Salud de Tucumán valide mediante comparación con los test comerciales.

COORDINADORES: Rosana Chehín (IMMCA)/Rossana Chahla (SIPROSA).

EQUIPO DE TRABAJO: Rodrigo Tomas Grau (IMMCA), Silvia Adriana Navarro (SkyBio LLC), Diego Ploper (IMMCA), César Avila (IMMCA), Benjamín Socías (IMMCA), Gabriela Perdígón (UNT-CONICET), Carolina Maldonado (UNT-CERELA), Silvia Cazzorla (UNT-CERELA), Eva Vélez (IMMCA), Dardo Costa (SIPROSA), Isolina Flores (SIPROSA), Claudia Rodriguez (SIPROSA), Mónica Aguilar López (SIPROSA), Verónica Oldano (SIPROSA), Roxana Toledo (UNT), Gabriela Apfelbaum (UNT), Rosana Chehín (IMMCA) y Conrado LLapur (SIPROSA).

RECURSOS MATERIALES INVOLUCRADOS:

Las tareas de clonado, expresión y purificación de proteínas específicas se llevará a cabo en el Instituto de Investigación en Medicina Molecular y Celular Aplicada (IMMCA). Este instituto cuenta con 180 m² de laboratorios situados en un predio perteneciente al Ministerio de Salud de Tucumán. Actualmente cuenta con el siguiente equipamiento totalmente operativo: microscopio confocal espectral ZEISS LSM800 con platina motorizada con control de deriva de foco ZDC, microscopio invertido con fluorescencia ZEISS AxioVert y contraste de fase ZEISS PrimoVert, espectrofluorómetro, dos espectrofotómetros, un FPLC AktaPure, un LM20 microfluidizer, incubadora de CO₂ con sistema de autoesterilización y control de estabilidad del pH, cabina de seguridad biológica tipo II (equipada con seguridad para el operario, muestra y medio ambiente), un lector de microplacas TECAN para lecturas de absorbancia, fluorescencia, luminiscencia, freezer -85°C, heladeras y freezers varios, estufas de cultivo microbiológicas, ultracentrífuga refrigerada y microcentrífugas, equipo para SDS-PAGE

En cuanto a los recursos económicos disponemos de aportes públicos y privados:

- PICT Raíces. Entidad financiadora: Mincyt. Monto \$ 925.313 Duración: 24 meses (2016-a la fecha). Código de proyecto: PICT-2015- 3201

- 2018-2020 France Parkinson. Multimodal doxycycline derivatives as potential drug candidates for Parkinson disease. Euros (€) 169.000

- 2019-2021 PICT -2018-03379. \$ 520.000

- 2019-2021 PICT-2018-02989. Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. \$ 260.000

- **Fondos privados involucrados en la financiación del proyecto:** SkyBio LLC (USA)

REFERENCIAS

1. Kuiken, T., Fouchier, R. A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G. F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J. D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W., Ling, A. E., Chan, P. K., Tam, J. S., Zambon, M. C., Gopal, R., Drosten, C., van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J. C., Stohr, K., Peiris, J. S. & Osterhaus, A. D. (2003) Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome, *Lancet*. **362**, 263-70.
2. Wu, Z. & McGoogan, J. M. (2020) Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention, *JAMA*.
3. Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. & Drosten, C. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Euro Surveill*. **25**.
4. Callow, K. A., Parry, H. F., Sergeant, M. & Tyrrell, D. A. (1990) The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man, *Epidemiol Infect*. **105**, 435-46.
5. Stadlbauer, D., Amanat, F., Chromikova, V., et al. (2020) SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup, *Curr Protoc Microbiol*. **57**(1):e100. doi:10.1002/cpmc.100.
6. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B.S. & McLellan, J. S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*. **367**(6483), 1260-1263.
7. Tai, W., Zhang, X., He, Y., Jiang, S., & Du, L. (2020) Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. *Antiviral research*, **179**, 104820.