

DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES POTENTES DE AMPLIO ESPECTRO CONTRA NUEVAS VARIANTES DEL SARS-COV-2, INCLUYENDO LA DELTA Y ÓMICRON

Keyla María Gómez Castellano, Marcela Hernández Ruiz, Sergio Andrés Torres Pérez, Sonia Mayra Pérez Tapia, Juan Carlos Almagro.

Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Ómicron designada como variante de preocupación

Desde el debut de la enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19) en diciembre de ese año en Wuhan, China, el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ha provocado cerca de 350 millones de infecciones con más de cinco millones de muertes a nivel global. Como parte del proceso natural de la evolución de virus, diversas variantes del SARS-CoV-2 se han reportado a lo largo de estos dos años. Estas variantes incluyen, entre otras, Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) y Ómicron (B.1.1.529). Algunas de estas variantes, en particular la Delta, han disminuido la eficacia de las vacunas y los tratamientos con anticuerpos terapéuticos. Además, se transmiten con mayor facilidad causando nuevos brotes infecciosos con un incremento en el número de contagios y fatalidades.

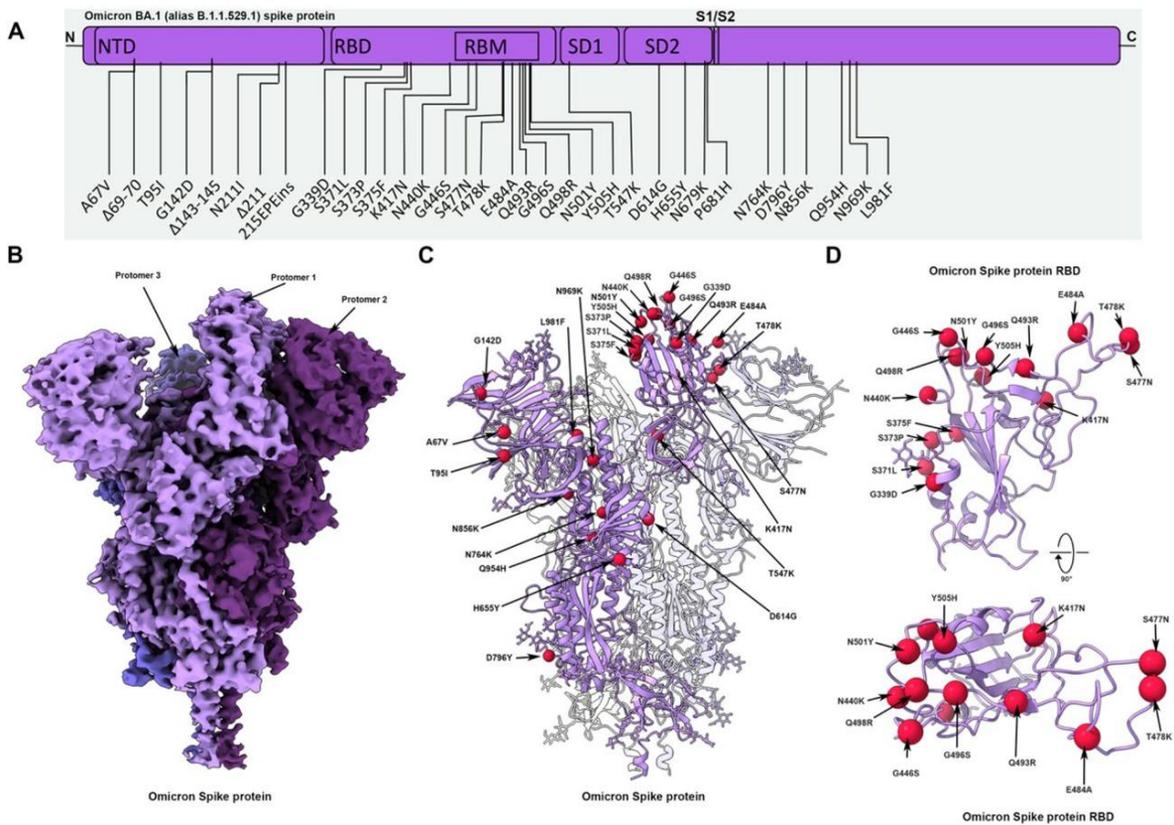


Figura 1. Estructura de criomicroscopía electrónica de la proteína S correspondiente a la variante Ómicron de SARS-CoV-2. (A) Diagrama que ilustra la disposición de los dominios de la proteína S y las mutaciones que presenta. (B) Representación de la proteína S de Ómicron a una resolución de 2,79 Å por criomicroscopía electrónica. Los protómeros están señalados en color púrpura. (C) Estructura de criomicroscopía electrónica de la proteína S de Ómicron que indica las mutaciones. (D) El dominio RBD de la proteína S de Ómicron mostrado en dos orientaciones ortogonales. Las posiciones α de los residuos mutados se muestran como esferas rojas. Tomado de Mannar y Cols., 2021 (4).

La variante Ómicron se detectó por primera vez en Sudáfrica en noviembre del 2021. Ómicron, hoy es la responsable de un incremento sin precedentes en el número de casos de COVID-19 y un nuevo pico de muertes (1,2). Esta variante nueva de SARS-CoV-2, ha mostrado el mayor número de mutaciones en la proteína de la espícula (S) que se haya registrado hasta el momento. Concretamente, la Ómicron presenta en la proteína S 30 substituciones de aminoácidos y una delección de seis residuos con respecto al aislado original en Wuhan (Wuhan-Hu-1). Estas mutaciones en la secuencia y estructura que se representan en la Figura 1 se han asociado con el incremento acelerado en el número de casos en múltiples países y al rápido desplazamiento de la variante Delta. Algunas de estas mutaciones se han asociado con un menor grado de neutralización por anticuerpos monoclonales terapéuticos (3).

Protección contra nuevas variantes de SARS-CoV-2 conferida por vacunas

Las vacunas han sido cruciales para limitar la posibilidad del desarrollo de enfermedad severa. Estas han sido diseñadas para inducir una respuesta mediada por anticuerpos contra la proteína S de SARS-CoV-2, todas basadas en la secuencia de aminoácidos del aislado original (5). Debido a la cantidad de mutaciones presentes en la variante Ómicron con respecto a Wuhan, principalmente en la proteína S del virus, los individuos con un esquema completo de vacunación, e incluso vacunados con más de un tipo de vacuna, pueden desarrollar signos y síntomas de la enfermedad en diferente magnitud.

La determinación del grado de protección ofrecido por las vacunas que se han administrado globalmente, está siendo abordada por diversos grupos de investigación. Por ejemplo, se ha demostrado un decremento o pérdida en la capacidad de neutralización hacia la variante Ómicron con los sueros de individuos con un esquema de vacunación completo con las vacunas de Moderna (mRNA-1273), Pfizer-BioNTech (BNT162b2) y Janssen/Jonhson and Jonhson (Ad26.COV2.S) (6).

El grupo *COVIDSurg Collaborative* de Reino Unido empleó sueros provenientes de individuos con esquema completo con las vacunas Oxford–AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19) o Pfizer–BioNTech (BNT162b2), obtenidos 28 días después de la segunda inmunización, para comparar su capacidad neutralizante contra los virus correspondientes a las variantes: Alpha (cepa Victoria), Beta, Delta y Ómicron, aislados de pacientes convalecientes (7). La media del nivel de neutralización de los virus activos, medidos a través de FNRT (Prueba de neutralización por reducción de focos) de los sueros de cada grupo se muestra en la tabla 1. Cabe destacar que los individuos incluidos en el estudio, fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra la nucleocápside del virus antes de la vacunación, lo que indica que no se habían infectado previamente con el SARS-CoV-2.

Tabla 1. Capacidad de neutralización de diversas variantes de SARS-CoV-2 por sueros de pacientes 28 días después de la segunda dosis de vacunación.

Vacuna/Variante	Títulos FNRT ₅₀			
	Alpha (cepa Victoria)	Beta	Delta	Ómicron
Oxford-AstraZeneca	133	42	52	10
Pfizer-BioNTech	1609	559	1358	54

FNRT₅₀: dilución recíproca de suero que neutraliza el 50% del virus.

A diferencia de estos individuos, aquellos que fueron inmunizados con una tercera dosis presentan mayor título de anticuerpos con la capacidad de neutralizar a la variante Ómicron, aunque con una potencia entre cuatro a seis veces menor con respecto a la capacidad de neutralización del aislado Wuhan-Hu-1. Dichos estudios se realizaron con pseudovirus de las variantes y se observó que la variante Ómicron, al igual que las otras variantes, emplea al receptor ACE2 (enzima convertidora de la angiotensina 2) para infectar a la célula blanco, pero es cuatro y dos veces más eficiente en el proceso de entrada a la célula con respecto a las variantes Wuhan-Hu-1 y Delta (5). Lo anterior sugiere que el nuevo repertorio de anticuerpos generado contra SARS-CoV-2, después de la tercera dosis, tiene mayor posibilidad de hacer reacción cruzada con la variante Ómicron, y explica parcialmente, la facilidad de contagio y diseminación de esta variante.

Desarrollo de anticuerpos monoclonales como tratamiento profiláctico y terapéutico para tratar la COVID-19

Diversas organizaciones tales como la OMS, los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (NIH) y El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. (CDC), han recomendado el desarrollo de fármacos convencionales y biológicos para hacer frente a la pandemia desencadenada por el SARS-CoV-2, siendo los anticuerpos recombinantes neutralizantes (NAbs), la alternativa más efectiva en personas con inmunodeficiencias, inmunosuprimidas y no vacunadas. El primer cóctel de anticuerpos terapéuticos para tratar la COVID-19 fue REGEN-COV, compuesto por casirivimab (REGN10933) e imdevimab (REGN10987), fue aprobado por la FDA para el tratamiento y profilaxis post-exposición al SARS-CoV-2 (8). Este tratamiento está indicado en situaciones de emergencia para pacientes positivos a la infección con SARS-CoV-2, que presentan mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

Cuatro medicamentos adicionales basados en anticuerpos han recibido autorización de uso por emergencia por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), incluido un cóctel desarrollado por Eli Lilly a base de bamlanivimab y etesevimab (9), sotrovimab comercializado por Glaxo Smith Klein, regdanvimab comercializado por Celltrion y, más recientemente, Evusheld de AstraZeneca (tixagevimab/ cilgavimab). Este último recibió la aprobación de uso por emergencia de la FDA para el tratamiento profiláctico de COVID-19 en ciertos adultos y niños (10). Docenas de otros anticuerpos neutralizantes se encuentran en ensayos preclínicos y clínicos, dirigidos a diversas proteínas del SARS-CoV-2 (11). Sin embargo, algunos de los anticuerpos aprobados por la FDA y la EMA, así como algunos en desarrollo, podrían tener una aplicación limitada ya que han presentado una disminución en la actividad neutralizante contra algunas variantes de preocupación (VOC, por sus siglas en inglés variants of concern) (12,13,14). Esto, sumado al hecho de que el SARS-CoV-2 seguirá evolucionando y muy probablemente generará otras variantes capaces de evadir la respuesta inmune, como se ha demostrado con la aparición de la Ómicron, ha dado lugar a una carrera continua para desarrollar nuevos y mejores anticuerpos terapéuticos en corto tiempo.

Los anticuerpos específicos para el RBD, tales como MV05 con modificaciones en el dominio Fc, son profilácticos y terapéuticos en primates infectados con SARS-CoV-2. El efecto profiláctico y terapéutico se demostró en monos Rhesus, a los cuales se les administró el anticuerpo MV05 vía intravenosa a una concentración de 20 mg/Kg un día antes del retar a los animales con 1×10^5 TCID₅₀ de SARS-CoV-2 por intubación traqueal (grupo profiláctico) o 40 mg/Kg un día después de retar a los animales (grupo terapéutico). La presencia del virus fue evaluada en muestras traqueales/bucofaringeas, cada día durante los siete días subsiguientes a la infección a través de RT-PCR cuantitativa. Se observó una reducción significativa en la detección de SARS-CoV-2 desde los días uno y dos post-infección en el grupo profiláctico y terapéutico, respectivamente (16).

De manera similar, los NAbS específicos para la región NTC de la proteína S han mostrado ser efectivos contra la infección con SARS-CoV-2. Dos anticuerpos, producidos por células B provenientes de pacientes convalecientes por COVID-19, COV2-2676 y COV2-2489 se evaluaron en el modelo de infección K18-hACE2 de SARS-CoV-2. Se administraron 200 µg de cada anticuerpo a los ratones un día antes (grupo profiláctico) o un día después (grupo terapéutico) del reto con 103 UFP (unidades formadoras de placa) de la cepa 2019n-CoV/USA_WA1-2020, y la evolución de los ratones se monitoreó durante siete días post-infección. En ambos grupos, los ratones tratados con los anticuerpos COV2-2676 y COV2-2489 mostraron un menor título viral en los tractos respiratorios alto y bajo, y en el corazón, así como una menor concentración de citocinas y quimiocinas inflamatorias en el pulmón y menor pérdida de peso con respecto a los ratones tratados con el isotipo del anticuerpo (17).

Desarrollo de anticuerpos terapéuticos en México

En la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI) del Instituto Politécnico Nacional, hemos desarrollado una plataforma tecnológica de vanguardia para el descubrimiento, desarrollo y optimización de anticuerpos monoclonales con potencial uso terapéutico (18,19,20). Construimos dos plataformas de descubrimiento, una formada por bibliotecas de despliegue en fagos semi-sintéticas llamadas ALTHEA Gold+ Libraries™ y otras construidas con el repertorio de un paciente convaleciente de COVID-19 llamadas ALTHEA SARS-CoV-2 Libraries™.

ALTHEA Gold+ Libraries™ son genotecas semisintéticas de fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpo (scFvs). Consta de un andamio o scaffold VH (3-23) y cuatro scaffolds VL distintos. Dos scaffolds, 3-20/4 y 4-01/4 provienen de ALTHEA Gold Libraries™ (18), y dos scaffolds (3-11/4 y 1-39/4) de nueva incorporación. Estas genotecas presentan diversidad natural en la tercera región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDRH3) proveniente de 200 donadores mexicanos sanos.

La plataforma de descubrimiento ALTHEA SARS-CoV-2 Libraries™ consiste en una genoteca de despliegue en fagos conformada por cuatro sub-bibliotecas de fago-anticuerpo (scFv) construidas a partir del repertorio VH de un paciente convaleciente infectado con la variante Delta de SARS-CoV-2. El repertorio inmune VH fue combinado independientemente con cuatro bibliotecas sintéticas VL con los scaffolds: 3-20/4, 4-01/4, 3-11/4 y 1-39/4 (20).

El proceso de selección de fago-anticuerpo específicos con ambas plataformas de descubrimiento se llevó a cabo mediante un tamizaje o panning empleando como selector el antígeno RBD del virus SARS-CoV-2. Después de tres rondas de tamizaje obtuvimos altos porcentajes de clonas específicas y mediante el análisis de secuencias, seleccionamos la clonas con secuencias únicas. Las mejores clonas de acuerdo con su secuencia, el perfil de unión a RBD silvestre (wild type, WT), RBD Delta y RBD Ómicron y la actividad bloqueadora de la unión del RBD:ACE2 fueron convertidas a formato IgG1 humano. Finalmente, los ensayos de neutralización viral in vitro nos permitieron seleccionar cuatro anticuerpos candidatos con potencial neutralizante.

Tres de los anticuerpos de este panel reconocen y neutralizan el aislado Wuhan-Hu-1 y a la VOC Delta. El cuarto anticuerpo, llamado A7, neutraliza las tres variantes del virus, incluyendo la Ómicron. En los tres primeros anticuerpos fue necesario un desarrollo posterior de maduración de la afinidad mediante la generación de bibliotecas de fago-anticuerpos y posterior tamizaje en condiciones astringentes, tales como: concentraciones sub-nanomolar del selector (RBD) e incremento en el número de lavados durante la selección, entre otros. En el caso de A7, no fue necesaria la optimización de la afinidad.

Un resumen de las características funcionales de los anticuerpos candidatos se presenta en la tabla 2. Las cuatro IgGs bloquean la unión del RBD (WT y Delta) al receptor ACE2. Por otra parte, las constantes de afinidad (KD) determinadas por resonancia superficial de plasmones se encuentran dentro de un rango de 0.046–6.45 nM conforme a los precedentes de los anticuerpos terapéuticos aprobados por la FDA y EMA para tratar la infección por SARS-CoV-2. Por último, los ensayos de neutralización in vitro en células VERO nos sugieren que los dos candidatos con mejor actividad neutralizante son los anticuerpos P5E1-A6-E6 y A7, con una concentración inhibitoria al 50% (IC50) de 0.37 y 0.55 nM, respectivamente.

Tabla 2. Resumen de las características funcionales de los anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 desarrollados en la UDIBI.

Clonas IgG1 candidatas	Unión al RBD WT de SARS-CoV-2	Unión al RBD Delta de SARS-CoV-2	Unión al RBD Ómicron de SARS-CoV-2	Bloqueo de la unión del RBD al receptor ACE2	Constante de afinidad por resonancia superficial de plasmones KD (nM)	Neutralización in vitro en células VERO, IC ₅₀ (nM)
P5E1-A6-E6	+++	+++	-	+++	0.677	0.37
P5A10-G2	+++	+++	-	+++	0.387	61.10
P5A10-G4	+++	++	-	+++	0.136	10.45
A7	+++	+++	+++	+++	0.681	0.55

Además de cumplir con las características funcionales, estos anticuerpos también presentaron un potencial de desarrollo farmacéutico (developability) consistente con el de anticuerpos terapéuticos en el mercado. Es decir, un alto contenido monomérico >95% después de la purificación con Proteína A en un solo paso, identidad por SDS-PAGE con las bandas esperadas en condiciones reductoras y no reductoras, alta estabilidad térmica y un rendimiento adecuado en la expresión transitoria en células HEK293T.

Actualmente dos de estos anticuerpos (P5E1-A6-E6 y A7) se encuentran en la etapa de desarrollo preclínico, cuyo objetivo es demostrar su seguridad y eficacia en modelos animales. Dada las características de afinidad y neutralización de estos anticuerpos, anticipamos que el desarrollo preclínico será exitoso, por lo que en paralelo, estamos preparando el material necesario para los ensayos clínicos. Una vez demostrada la baja toxicidad y eficacia en humanos, y debido a la poca eficacia de otros anticuerpos aprobados en humanos con las nuevas VOCs, estaríamos a la vanguardia al ofrecer más y mejores opciones de tratamiento para el SARS-CoV-2. De esta forma, haremos frente a posibles nuevas olas de infección por este virus. Además, gracias al desarrollo de un kit diagnóstico único en México y la colaboración con diversos grupos en el área de vacunas, la UDIBI-IPN se encuentra en una posición ventajosa, para el desarrollo de tres pilares fundamentales (profiláctico, diagnóstico y terapéutico) que permiten enfrentar tanto la COVID-19, como otras enfermedades infecciosas, que pudieran surgir en el futuro.

Referencias:

1. Center for Disease Control and Prevention. (Enero 26, 2022). *COVID data tracker*. https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#cases_deaths.
2. World Health Organization. (Noviembre 26, 2021). *Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern*. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)
3. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases. CDC COVID-19 Science Briefs [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2020-. Science Brief: Omicron (B.1.1.529) Variant. 2021 Dec 2. PMID: 34932278.
4. Mannar, Dhiraj et al. "SARS-CoV-2 Omicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex." *Science (New York, N.Y.)*. eabn7760. 20 Jan. 2022. doi:10.1126/science.abn7760
5. Xia, Xuhua. "Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design." *Viruses* vol. 13,1 109. 14 Jan. 2021. doi:10.3390/v13010109
6. Garcia-Beltran, Wilfredo F et al. "mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant." *Cell*. S0092-8674(21)01496-3. 6 Jan. 2022. doi:10.1016/j.cell.2021.12.033
7. Dejnirattisai, Wanwisa et al. "Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B.1.1.529 variant by post-immunisation serum." *Lancet (London, England)* vol. 399,10321 (2022): 234-236. doi:10.1016/S0140-6736(21)02844-0
8. U.S. Food and Drug Administration. (Octubre 10, 2021). *FDA authorizes REGEN-COV monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19*. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-regen-cov-monoclonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis-prevention-covid-19>.
9. U.S. Food and Drug Administration. (Septiembre 16, 2021). *FDA authorizes bamlanivimab and etesevimab monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19*. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-bamlanivimab-and-etesevimab-monoclonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis>.
10. U.S. Food and Drug Administration. (Diciembre 08, 2021). *Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes New Long-Acting Monoclonal Antibodies for Pre-exposure Prevention of COVID-19 in Certain Individuals*. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-new-long-acting-monoclonal-antibodies-pre-exposure?utm_medium=email&utm_source=govdelivery
11. Deb, Paroma et al. "An update to monoclonal antibody as therapeutic option against COVID-19." *Biosafety and health* vol. 3,2 (2021): 87-91. doi:10.1016/j.bsheal.2021.02.001
12. Planas, Delphine et al. "Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization." *Nature* vol. 596,7871 (2021): 276-280. doi:10.1038/s41586-021-03777-9
13. Chen, Rita E et al. "Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies." *Nature medicine* vol. 27,4 (2021): 717-726. doi:10.1038/s41591-021-01294-w
14. Choi, Jun Yong, and Davey M Smith. "SARS-CoV-2 Variants of Concern." *Yonsei medical journal* vol. 62,11 (2021): 961-968. doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961
15. Du, Lanying et al. "Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19." *Cellular & molecular immunology* vol. 18,10 (2021): 2293-2306. doi:10.1038/s41423-021-00752-2
16. Wang, Shuang et al. "Characterization of neutralizing antibody with prophylactic and therapeutic efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus monkeys." *Nature communications* vol. 11,1 5752. 13 Nov. 2020. doi:10.1038/s41467-020-19568-1
17. Suryadevara, Naveenchandra et al. "Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein." *Cell* vol. 184,9 (2021): 2316-2331.e15. doi:10.1016/j.cell.2021.03.029
18. Valadon, Philippe et al. "ALTHEA Gold Libraries™: antibody libraries for therapeutic antibody discovery." *mAbs* vol. 11,3 (2019): 516-531. doi:10.1080/19420862.2019.1571879
19. Almagro, Juan C et al. "Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development." *Antibodies (Basel, Switzerland)* vol. 8,3 44. 23 Aug. 2019. doi:10.3390/antib8030044
20. Mendoza, Ivette et al. "Anti-SARS-CoV-2 Omicron antibodies isolated from a SARS-CoV-2 Delta semi-immune phage display library." (enviado a Antibodies)