

ARTÍCULO ORIGINAL

Producción de partículas virales pseudotipadas SARS-CoV-2 para la evaluación de nuevas terapias para COVID-19

Etchevers L^{1,2,#}; Silvestrini P^{1,2,#}; Velazquez NS^{1,2}; Baravalle ME^{1,2,3}; Renna MS^{1,2,4}; Olmos F^{1,2}; Ortega HH^{1,2,4}; Marelli BE^{1,2,4}

- 1 Centro de Medicina Comparada (CMC), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- 2 Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, ICiVet-Litoral), UNL / CONICET. Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- 3 Centro Universitario de Gálvez, UNL, Gálvez, Santa Fe, Argentina.
- 4 Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

* Correspondencia: Belkis E. Marelli. ICiVet Litoral, UNL-CONICET, R.P. Kreder 2805, (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina. E-mail: bmarelli@fcv.unl.edu.ar

Ambos autores contribuyeron en partes iguales al desarrollo del trabajo.

Recibido: 10 Septiembre 2021. Aceptado: 23 Mayo 2022. Disponible en línea: 24 Mayo 2022

Editor: P. Beldomenico

RESUMEN. La inmunoterapia pasiva como tratamiento contra el virus SARS-CoV-2 (del inglés, *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2*) requiere de la cuantificación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos para el desarrollo de terapias efectivas. Para ello, es necesario el uso de partículas virales pseudotipadas no replicativas. Sin embargo, los reactivos de transfección necesarios para su producción son costosos y, en consecuencia, resulta una limitante al momento de escalar la producción. Una manera de eludir esta limitante es el uso de la polietilenimina (PEI), un polímero catiónico de bajo costo. El objetivo del trabajo consistió en optimizar un ensayo de transfección transitoria de bajo costo para producir pseudopartículas virales que expresen la proteína Spike del virus SARS-CoV-2. Se realizaron ensayos de transfección en células HEK-293T evaluando diferentes concentraciones de PEI y tiempos de incubación. La transfección se evaluó mediante microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo, mostrando que la condición de transfección que tiende a arrojar mejores resultados fue luego de 48 horas de incubación utilizando una relación 1/10 (ADNp/PEI). En conclusión, se ha logrado adaptar un protocolo para producir partículas lentivirales que expresan Spike utilizando un reactivo de transfección de bajo costo. Esto permitiría escalar la producción para, posteriormente, diseñar una plataforma para evaluar terapias para COVID-19.

RESUMEN. Production of SARS-CoV-2 pseudotyped viral particles for the evaluation of new therapies against COVID-19. Passive immunotherapy as a treatment against SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) requires to quantify neutralizing capacity of antibodies for development of effective therapies. However, the transfection reagents necessary for its production are expensive and, consequently, it is a limitation for the scaling up production. Using of polyethyleneimine (PEI), a low-cost cationic polymer, allows to avoid this. The objective of this work was to optimize a low-cost transient transfection assay to produce pseudoparticles that express the Spike protein of SARS-CoV-2. Transfection assays were performed in HEK-293T cells treated with different PEI concentrations and evaluating different incubation times. Transfection was assessed by epifluorescence microscopy and flow cytometry, showing that the transfection condition that tends to yield better results was after 48 hours of incubation using a 1/10 ratio (pDNA / PEI). In conclusion, it has been possible to adapt a protocol to produce spike-expressing lentiviral particles using a low-cost transfection reagent. This would allow to scale up the production and, following, to design a platform for evaluation of COVID-19 therapies.

Palabras clave: polietilenimina, Spike, transfección transitoria, lentivirus

Keywords: polyethyleneimine, Spike, transient transfection, lentivirus

Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se ha originado en China y luego expandido rápidamente al resto del mundo, siendo declarada como una emergencia de salud pública de preocupación internacional por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Burgos *et al.*, 2020). Es por eso que, la propagación exponencial del SARS-CoV-2, ha requerido una respuesta global para mitigar las consecuencias de la pandemia.

El genoma de SARS-CoV-2 es de tipo ARN monocatenario de sentido positivo. El material genético se encuentra protegido por las proteínas de la nucleocápside y, además, por otras tres proteínas estructurales: una proteína de membrana, una proteína de envoltura y la proteína de espiga (S o Spike) (Wang *et al.*, 2020). En particular, la proteína Spike resulta fundamental para la infección de las células huésped, por lo que se ha convertido en un objetivo como blanco terapéutico de gran interés. De hecho, los análisis de la respuesta humoral frente a SARS-CoV-2 demostraron que la infección induce anticuerpos de tipo IgG e IgM contra la proteína Spike y contra su dominio de unión al receptor RBD (del inglés, receptor binding domain) (Mendoza-Pinto *et al.*, 2020; Nie *et al.*, 2020; Okba *et al.*, 2020; Rogers *et al.*, 2020; Suthar *et al.*, 2020). Si bien la vacunación es una herramienta de prevención primaria fundamental, la inmunoterapia surge como una alternativa de tratamiento terapéutico con resultados positivos, sobre todo para aquellos pacientes que desarrollan un estado moderado de la enfermedad. La inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos neutralizantes como ser anticuerpos monoclonales, plasma de pacientes convalescentes, sueros hiperinmunes o inmunoglobulinas purificadas, es uno de los pilares de las terapias inmunes pasivas. Este tipo de abordaje terapéutico, a través de la transferencia de anticuerpos específicos para la proteína Spike, bloquea la internalización del SARS-CoV-2 en las células pulmonares (Zylberman *et al.*, 2020). Frente a la relevancia de la inmunidad pasiva con fines terapéuticos, cuantificar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-Spike resulta clave para el desarrollo de terapias efectivas para la infección por SARS-CoV-2. La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT, del inglés Plaque Reduction Neutralization Test) es considerada la *gold standard* o prueba de referencia para la detección de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 (von Rhein *et al.*, 2021). No obstante, otras metodologías como los ensayos de neutralización con pseudopartículas virales y los ELISA (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) de competición basados en la prueba de neutralización de virus sustituto representan alternativas valiosas (Abe *et al.*, 2020; Crawford *et al.*, 2020; Bošnjak *et al.*, 2021, Nie *et al.*, 2020). En relación a ello, los ensayos de PRNT presentan una gran limitación ya que requieren el uso del virus salvaje y, por lo tanto, de instalaciones adecuadas con niveles de bioseguridad tipo 3 (BSL-3; del inglés, *Biosafety Level 3*). Una alternativa para eludir estas limitaciones consiste

emplear la proteína Spike, dado que la misma puede ser pseudotipada en partículas lentivirales no replicativas, y por lo tanto, más seguras (Crawford *et al.*, 2020). Las pseudopartículas virales contienen la glicoproteína de superficie del virus patógeno incorporada en una partícula viral de replicación defectuosa que posee un sistema indicador. De esta manera, las pseudopartículas virales ingresan a las células utilizando la glicoproteína del virus patógeno, permitiendo imitar y evaluar el proceso infeccioso (Johnson *et al.*, 2020). El uso de las partículas lentivirales, permite realizar ensayos de neutralización en laboratorios de menor complejidad con un sistema de seguridad tipo 2 (BSL-2; del inglés, *Biosafety Level 2*). Las pseudopartículas virales también representan una herramienta valiosa debido a su potencialidad de aplicación en la evaluación preclínica de candidatos vacunales e inmunoterapias en estudios de eficacia *in vivo*. La combinación del uso de pseudovirus con sistemas de bioimágenes *in vivo* representa una tecnología innovadora para la evaluación cualitativa de la biodistribución dinámica espacial y temporal de éstos en un mismo animal (Czakó *et al.*, 2017).

Desafortunadamente, los reactivos de transfección necesarios para la producción de las pseudopartículas virales disponibles en el mercado son costosos y, por lo tanto, resultan una limitante al momento de escalar la producción (Huang *et al.*, 2013). En ese contexto, el uso de la polietilenimina (PEI), un polímero catiónico de bajo costo, permite sortear esta dificultad. El polímero PEI forma interacciones iónicas con el ADN formando un complejo ADN/PEI que se transporta al interior de la célula mediante endocitosis (Ehrhardt *et al.*, 2006). Sin embargo, resulta crítico optimizar diversas variables, como el número de células, la concentración de PEI y de ADN, el tiempo de incubación y la adición de suplementos, para optimizar los títulos de partículas virales. Es por eso que, el objetivo del presente trabajo consistió en optimizar un ensayo de transfección transitoria, en células HEK-293T para la producción de pseudo-partículas virales que expresen la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 para ser utilizadas en ensayos de neutralización para la evaluación de tratamientos para COVID-19.

Materiales y métodos

Plásmidos

Los plásmidos fueron donados por PhD. Jesse D. Bloom (*Division of Basic Sciences and Computational Biology Program, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Estados Unidos*). Se recibió un plásmido que codifica para la proteína Spike, tres plásmidos auxiliares necesarios para el ensamblaje de las partículas lentivirales y un plásmido que codifica para los genes reporteros luciferasa y ZsGreen, los cuales se detallan a continuación:

- pLuc2-ZsGreen (*catalog number* NR-52516): plásmido que codifica para los genes reporteros luciferasa y ZsGreen bajo un promotor de CMV (citomegalovirus).
- p-Gal-Pol (*catalog number* NR-52517): plásmido lentiviral que expresa VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) Gag-Pol bajo un promotor de CMV.
- p-tat (*catalog number* NR-52518): plásmido lentiviral que codifica la proteína Tat del VIH bajo el promotor de CMV.
- p-Rev (*catalog number* NR-52519): plásmido lentiviral que codifica para la proteína Rev del HIV bajo un promotor de CMV.
- p-Spike (*catalog number* NR-52514): plásmido que expresa, bajo un promotor de CMV, la proteína Spike de SARS-CoV-2 cepa Wuhan-Hu-1 (Genbank NC_045512) con secuencia de codones optimizada usando IDT y la secuencia Kozak.

Todas las secuencias plasmídicas se encuentran disponibles en la base de datos de *BEI Resources* (<https://www.beiresources.org/>).

Preparación de ADNp

Escherichia coli DH5 α competentes fueron transformadas para la obtención de los clones de interés. Las mismas fueron transformadas con 20-50 ng/ μ l de ADNp (ADN plasmídico) mediante choque térmico, siguiendo las indicaciones descriptas por Seidman et al. (2001). Brevemente, las bacterias fueron acondicionadas con la solución transformante (ST) 1 (buffer MOPS 10mM, KCl 10 mM, pH=7,0) en hielo y, luego, incubadas durante 1 h con la ST2 (buffer MOPS 100mM, KCl 10mM, CaCl₂·2H₂O 50 mM, pH=6,5) y el ADNp, en hielo. Finalmente, se realizó el choque térmico a 42°C para que las bacterias incorporen el ADNp. Los clones de interés fueron seleccionados en placas de LB-agar (Britania, Buenos Aires, Argentina) con ampicilina 100 μ g/ml (Ap₁₀₀).

Una vez obtenidos los clones fueron amplificados en medio líquido LB (Britania, Buenos Aires, Argentina) suplementado con Ap₁₀₀ para proceder con la preparación de ADNp. La extracción se realizó utilizando el kit comercial Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). Luego, se determinó la concentración y pureza del ADNp obtenido mediante lectura espectro-fotométrica, utilizando un lector para microplacas Clariostar Plus (BMG-LABTECH, Ortenberg, Alemania). Se seleccionaron aquellas preparaciones de ADNp con relaciones de absorbancia 260/280 \geq 1,8 y 260/230 \geq 1,9. Finalmente, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron provistas por PhD. Jesse D. Bloom. Las mismas se detallan a continuación:

- HEK-293T (ATTC[®] CRL-3216TM): del inglés, *Human Embryonic Kidney – 293T*. Esta línea celular se utilizó en los ensayos de transfección.
- HEK-293T-hACE2 (*BEI Resources* NR-52512): células HEK-293T que expresan el receptor humano ACE2 (del inglés, angiotensin-converting enzyme 2) de forma constitutiva. ACE2 se expresa en diferentes tejidos del organismo, incluyendo corazón, riñón, intestino delgado y pulmón. La proteína Spike del SARS-CoV-2 media la unión viral al receptor ACE2 del huésped. Esta proteína forma un trímero y, cuando se une a ACE2, permite la fusión de las membranas viral y celular, lo que permite la entrada y la replicación viral.

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, Gibco, Nueva York, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino inactivado 10% (Internegocios SA, Buenos Aires, Argentina), antibiótico-antimicótico 1x (Gibco) y L-glutamina 2 mM (Gibco) (medio D10), e incubadas a 37°C y 5% CO₂.

Ensayo de transfección

Para la obtención de las partículas lentivirales pseudotipadas se siguió la metodología descrita por Crawford et al. (2020) con algunas modificaciones. Brevemente, se sembraron 5x10⁵ células HEK-293T por pocillo en placa de 6 pocillos. Luego de 16-18 h de incubación (60-70% de confluencia), las células fueron co-cultivadas con solución de transfección, la cual se constituyó con una cantidad constante de ADNp y cantidades variables de PEI (PoliAr87, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron 0,20 μ g de pLuc2-ZsGreen-16, 0,132 μ g de los plásmidos estructurales (p-Gal-Pol, p-tat y p-Rev) y 0,07 μ g p-Spike por pocillo. Luego, se adicionó la cantidad de PEI necesaria para evaluar las siguientes relaciones 1/1,25; 1/2,5; 1/5 y 1/10 ADNp/PEI. Transcurridas 3 h de transfección, se llevó cada pocillo a volumen final de 3 ml con medio D10 fresco y, las células, fueron incubadas durante 24 y 48 h adicionales a 37°C, 5% CO₂. Paralelamente, se utilizaron células HEK-293T sin transfectar como control negativo. Cada condición experimental (relación ADNp/PEI y tiempo de incubación) fue evaluada por triplicado. Los sobrenadantes con las pseudopartículas virales fueron recolectados y almacenados a -80°C para posteriores ensayos de titulación.

Evaluación de la eficiencia de transfección

La eficiencia de transfección se evaluó mediante citometría de flujo (CF). Para este fin, luego de 24 y 48 h de incubación, las células fueron tratadas con tripsina (tripsina-EDTA, Gibco), resuspendidas en fluido de

enfoque (Attune 1x Focusing fluid, Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos) y adquiridas en el citómetro Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (A24860, Life Technology). Para el análisis de la población de interés, se realizó un gráfico de dot-plot de tamaño (forward scatter, FSC), donde se representó altura (FSC-H) versus área (FSC-A) para seleccionar de células únicas (región R1). Dentro de esa región, se realizó un gráfico dot-plot de tamaño celular versus complejidad celular para seleccionar la población de células HEK-293T (región R2). Finalmente, en la región R2 se evaluó el porcentaje de células transfectadas que expresan (%) el gen reportero ZsGreen (R3) en un gráfico de tipo histograma, utilizando como referencia la autofluorescencia basal de las células sin transfectar. En todos los casos, se adquirieron 500.000 eventos en R1. Los archivos de datos obtenidos luego de la adquisición de las células, fueron analizados empleando el software FlowJo (TreeStar Inc., Estados Unidos).

Por otro lado, mediante microscopía de epifluorescencia se tomaron imágenes representativas de los pocillos en campo claro y en fluorescencia en el canal verde utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer Fluorescent Microscope (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Los resultados fueron expresados como la media del % ZsGreen \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistic 22 (SPSS Inc., Illinois, Estados Unidos). La distribución y homogeneidad de los datos fueron analizadas con los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Luego, las diferencias estadísticas se evaluaron con un test de modelos lineales generalizados. Para ello se utilizó la función de enlace log y se evaluó el efecto de μg de PEI, el tiempo de transfección y la interacción de ambos factores (tiempo-PEI). Las diferencias con valores de $p < 0,05$ se consideraron como significativas y con valores entre $0,05 < p < 0,10$, como tendencia.

Ensayo de titulación

Para la titulación de las partículas lentivirales se sembraron $1,25 \times 10^4$ células HEK-293T-ACE2 en medio D10 por pocillo de una placa negra de 96 pocillos (apta para cultivo) pretratada con poli-L-lisina (Sigma - Aldrich, Burlington, Estados Unidos). Luego de 12-24 h de incubación, el medio de cultivo de los pocillos se reemplazó por diluciones seriadas del virus (sobrenadantes provenientes de los ensayos de transfección) preparadas en medio D10. A las 48 h post-infección, el ensayo se reveló utilizando el kit comercial Steady-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las lecturas de luminiscencia (URL, unidades relativas de luminiscencia) se obtuvieron en un espectrofotómetro Clariostar Plus (BMG-LABTECH). Finalmente, se graficaron las URL versus las diluciones de las partículas lentivirales. El título viral se determinó como el promedio de las URL/ml, por la inversa del factor de dilución aplicado,

de al menos 3 puntos comprendidos en la parte lineal de la curva de titulación (Crawford et al., 2020).

Ensayo de neutralización

Para los ensayos de neutralización se sembraron $1,5 \times 10^4$ células HEK-293T-hACE2 en medio D10 en una placa de 96 pocillos como se describe anteriormente. Las placas se incubaron 8-12 h a 37°C y 5% de CO₂. Aproximadamente 1,5 h antes de infectar las células, se prepararon las diluciones seriadas de los sueros a evaluar en medio D10. Estos fueron: CoviFab (fragmento F(ab')₂ específico para el RBD de SARS-CoV-2 derivado de anticuerpos policlonales equinos, INMUNOVA S.A., Buenos Aires, Argentina.) (Zylberman et al., 2020), un pool de sueros de pacientes convalescentes y un suero inespecífico como control negativo (NEAST, del inglés, Neutralizing Equine Anti Shiga Toxin antibodies, INMUNOVA S.A.) (Hiriart et al., 2018). Por otra parte, se realizó una dilución del sobrenadante conteniendo las partículas lentivirales, titulado previamente, para obtener un título equivalente a 40.000 URL/ml. Finalmente se preparó la mezcla de neutralización agregando un volumen de la dilución las partículas lentivirales a un volumen equivalente de las diluciones de los sueros. Luego de la incubación durante 1 h a 37°C, las mezclas fueron trasvasadas a los pocillos sembrados previamente. Pocillos de células (C) fueron incubados únicamente con la dilución de las partículas lentivirales (V) (control C+V, 100% luminiscencia, 0% de neutralización). Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂. El ensayo se reveló utilizando el kit comercial Steady-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. El porcentaje de neutralización se calculó como la diferencia respecto al porcentaje de luminiscencia obtenido en relación al control C+V. Los resultados fueron expresados como la media del % de neutralización \pm EEM para cada condición analizada por triplicado.

Resultados

Se observó un efecto de la masa de PEI ensayada (μg) ($p < 0,001$) y de la interacción tiempo-PEI ($p < 0,001$) sobre el % de células ZsGreen positivas. No se observó efecto del tiempo ($p > 0,05$) sobre la variable de interés.

El análisis de las diferentes condiciones arrojó que el % de células ZsGreen positivas fue similar entre las condiciones 1/1,25; 1/2,5; 1/5 y 1/10 (ADNP/PEI) a las 24 h y 1/2,5; 1/5 y 1/10 a las 48 h de transfección. Además, el % de células ZsGreen positivas resultó ser menor en la condición de 1/1,25 ADNP/PEI a las 48 h respecto al resto de las condiciones evaluadas ($p < 0,001$). Finalmente, se observó a las 48 h una tendencia a un mayor % de células ZsGreen en la condición 1/10 (ADNP/PEI) respecto de la condición 1/2,5 ($p = 0,066$) (Figura 1).

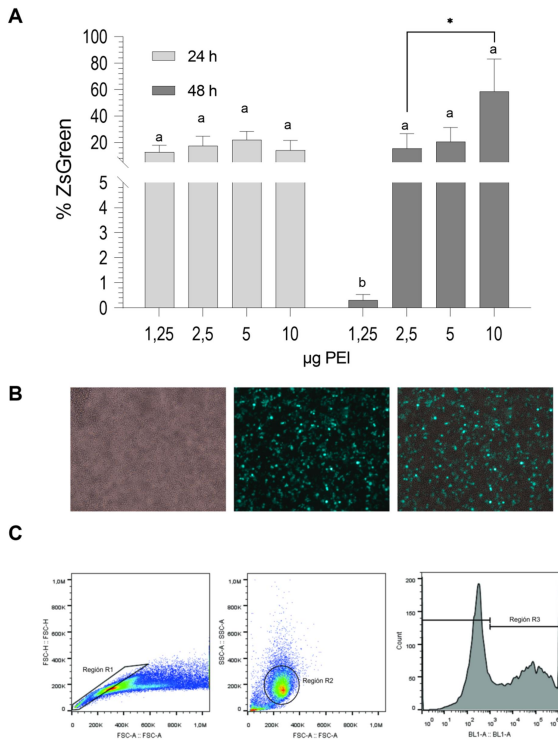


Figura 1. A) Porcentaje de células ZsGreen positivas en las diferentes condiciones de tiempo (24 y 48 h) y de PEI (1,25; 2,5; 5 y 10 µg) utilizadas en la transfección de células HEK-293T. Los resultados se muestran como la media ± EEM. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El asterisco (*) indica una tendencia ($p = 0,066$). B) Imágenes representativas de la microscopía de epifluorescencia mostrando la condición de transfección 1:10 (ADNP/PEI) donde se observan las células HEK-293 T luego de 48 h. A la izquierda, el campo claro; en el centro, el canal verde y a la derecha, la superposición de ambos canales. C) Esquema representativo de la estrategia de análisis de citometría de flujo para la evaluación del porcentaje de células ZsGreen positivas.

Por otra parte, mediante el ensayo de neutralización fue posible comprobar que las partículas lentivirales pseudotipadas con Spike eran reconocidas por el CoviFab y por sueros de pacientes convalescentes, neutralizando su ingreso a las células recombinantes HEK-293T-hACE2 proporcionalmente a las diluciones de anticuerpos o sueros evaluados (Figura 2). En el caso del suero inespecífico NEAST no se observó actividad neutralizante relevante, confirmando que la reacción de neutralización era específica.

Discusión

A pesar de que actualmente se encuentran desarrollados protocolos para producir de manera eficiente

pseudopartículas virales, los altos costos de los reactivos de transfección empleados, como Lipofectamine™, SuperFect® y FuGENE® entre otros, limitan las aplicaciones a gran escala (Yang et al., 2017). Una manera de eludir esta limitante, es el uso de PEI, un polímero catiónico no viral, como reactivo de transfección. Además, debido a su baja toxicidad, costo e inmunogenicidad puede ser usado tanto en células adherentes como en células en suspensión (Aslan et al., 2006). Los complejos ADN/PEI protegen al ADN de la degradación lisosomal y facilitan la incorporación del material genético en las células eucariotas. Sin embargo, la eficiencia de transfección utilizando PEI depende en gran medida de las condiciones y entorno en el que se forman los complejos ADN/PEI (Yang et al., 2017). Tal es así que, variables como la concentración de ADN y la relación ADN/PEI son parámetros críticos a la hora de diseñar el ensayo de transfección. Es por ello que en el presente trabajo se propuso adaptar un método de transfección transitoria para la producción de partículas lentivirales pseudotipadas SARS-CoV-2 utilizando un reactivo comercial de bajo costo.

Nuestros resultados indican que la condición de transfección donde se utilizó una relación 1/10 (ADNP/PEI) y 48 h de incubación tiende a ser superior respecto a las demás condiciones experimentales evaluadas. En este caso, se optó por evaluar el porcentaje de células transfectadas (aquellas que expresan ZsGreen) a través de citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia. En particular, la CF resultó ser altamente sensible ya que, aún en condiciones donde la eficiencia de transfección fue baja (1/1,25 – 48 h), se detectaron células ZsGreen positivas. Por otra parte, el ensayo de neutralización nos permitió comprobar que el ensayo de transfección diseñado en células HEK-293T fue adecuado para la producción de partículas lentivirales pseudotipadas con la proteína Spike del SARS-CoV-2. Esto se desprende del hecho de que dichas partículas lentivirales fueron capaces de transducir células HEK-293T-hACE2 y fueron reconocidas por anticuerpos anti-Spike como el CoviFab o aquellos presentes en el suero de pacientes convalescentes.

Existen otras alternativas para la producción de partículas virales que expresen Spike. Por ejemplo, Nie et al. (2020) desarrollaron un protocolo para producir pseudopartículas virales del SARS-CoV-2 utilizando el sistema de empaquetado del virus de la estomatitis vesicular (VSV). A diferencia de las pseudopartículas virales basadas en VSV, los virus pseudotipados basados en lentivirus tienen un título relativamente bajo, por lo cual se requiere de metodologías más sensibles para poder cuantificarlos. Además, en los ensayos de neutralización, el uso de partículas pseudotipadas basadas en lentivirus requieren mayores tiempos de incubación en relación a las pseudopartículas virales basadas en VSV (Nie et al., 2020).

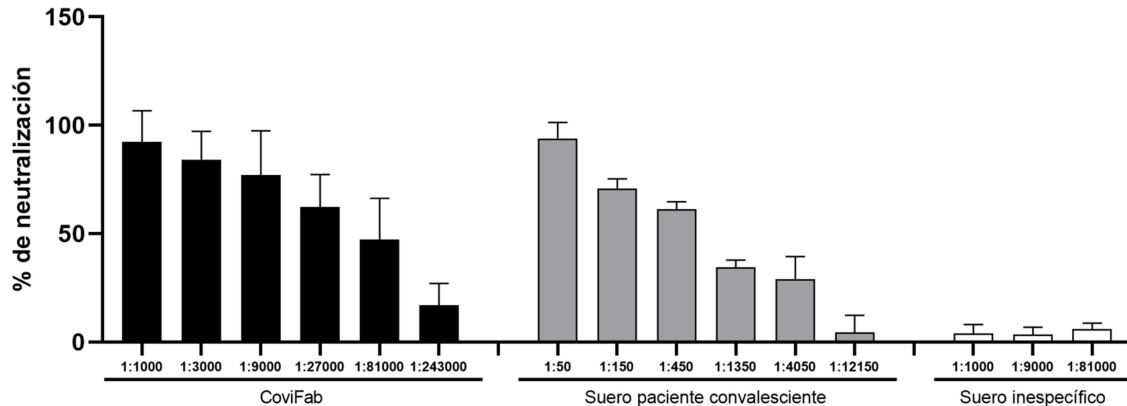


Figura 2. Ensayo de neutralización de las partículas lentivirales pseudotipadas con Spike de SARS-CoV-2 en células HEK-293T-hACE2 frente a diluciones seriadas de CoviFab, suero de pacientes convalescentes y suero inespecífico NEAST (control negativo). Los resultados se muestran como la media ± EEM.

En oposición a los resultados obtenidos en este trabajo, Johnson et al. (Johnson *et al.*, 2020) evaluaron la producción de pseudopartículas virales utilizando tres sistemas de empaquetado (MLV, VSV y HIV), junto a otras estrategias de expresión como mutaciones puntuales. Sus resultados mostraron que la expresión de la proteína Spike en forma completa fue ineficiente en los tres sistemas de empaquetado. Sin embargo, observaron que al eliminar los últimos 19 aminoácidos de la región C-terminal, la producción se incrementaba. En contraposición, Crawford et al. (2020) sugieren que la modificación del extremo C-terminal de Spike no mejora los títulos de partículas lentivirales. Estas discrepancias de resultados pueden deberse a los diferentes diseños experimentales implementados.

Los ensayos tradicionales para evaluar actividad neutralizante de anticuerpos, como los PRNT, requieren largos tiempos de incubación, son técnicamente desafiantes y no son aptos para la detección rápida de cientos o miles de muestras (Vanderheiden *et al.*, 2020). Es por eso que se requiere con urgencia métodos estandarizados para evaluar la potencia de los productos antivirales en las fases preclínica y clínica. Además, la detección de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 sería una herramienta útil para evaluar la respuesta inmune protectora entre los pacientes con COVID-19.

En el último año se han explorado gran cantidad de estrategias de prevención a largo plazo mediante el desarrollo de vacunas utilizando diferentes plataformas biotecnológicas. De hecho, según datos de OMS, hasta junio 2021 existen 18 vacunas aprobadas, 98 candidatos vacunales en fase clínica y otros 224 en fase preclínica. Los obstáculos en el desarrollo de vacunas incluyen la dificultad para validar y optimizar las tecnologías de producción y la capacidad de generar respuesta inmune robusta a largo plazo (Chung *et al.*, 2021). Sin embargo, las posibilidades de infecciones recurrentes de SARS-CoV-2 seguirán requiriendo intervenciones terapéuticas. En ese contexto, el uso de

medicamentos o de inmunoterapias, resulta imprescindible para el control de la pandemia (Fontanet and Cauchemez, 2020).

En conclusión, en el presente trabajo se ha logrado adaptar un protocolo para producir partículas lentivirales pseudotipadas que expresan Spike, utilizando un reactivo de transfección de bajo costo. Esto permitiría producir las pseudopartículas virales en mayor escala para, posteriormente, diseñar y validar una plataforma para la evaluación de nuevas terapias para COVID-19.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Inmunova S.A., a la Dra. Jesse Bloom del Centro de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson de la Universidad de Washington (Seattle, USA) y al Dr. Claudio Prieto del Centro Biotecnológico del Litoral (FBCB-UNL) por el soporte técnico.

El presente trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto DEMES-2020-007 (Demandas estratégicas en el marco de la emergencia sanitaria 2020) de la Agencia Santafesina de Ciencia Tecnología e Innovación, Santa Fe, Argentina.

Referencias

- Abe K, Li Z, Samson R, Samavarchi-Tehrani P, Valcourt E, Wood H, Budykowski P, Dupuis A, Girardin R, Rathod B, Wang J, Barrios-Rodiles M, Colwill K, McGeer A, Mubareka S, Gommerman J, Durocher Y, Ostrowski M., McDonough K., Drebot M, Drews S, Rini J, Gingras A. 2020. JCI Insight 5: e142362.
- Aslan H, Zilberman Y, Arbely V, Sheyn D, Matan Y, Liebergall M, Li JZ, Helm GA, Gazit D, Gazit Z. 2006. Nucleofection-Based Ex Vivo Nonviral Gene Delivery to Human Stem Cells as a Platform for Tissue Regeneration. Tissue Eng. 12: 877-889.

- Bošnjak B, Stein S, Willenzon S, Cordes A, Puppe W, Bernhard G, Ravens I, Ritter C, Schultze-Florey CR, Gödecke N, Martens J, Kleine-Weber H, Hoffmann M, Cossmann A, Yilmaz M, Pink I, Hoepfer MM, Behrens GMN, Pöhlmann S, Blasczyk R, SchulzTF, Förster R. 2021. Low serum neutralizing anti-SARS-CoV-2 S antibody levels in mildly affected COVID-19 convalescent patients revealed by two different detection methods. *Cell Mol. Immunol.* 18(4): 936-944.
- Burgos LM, Diez M, Villalba L, Miranda RM, Belardi J. 2020. Impacto de la pandemia por COVID-19 en las hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca. *Medicina (B. Aires)* 80: 315-316.
- Czakó R, Vogel L, Lamirande EW, Bock KW, Moore IN, Ellebedy AH, Ahmed R, Mehle A, Subbarao K. 2017. In Vivo Imaging of Influenza Virus Infection in Immunized Mice. *mBio* 8: e00714-17.
- Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. 2021. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170: 1-25.
- Crawford KHD, Eguia R, Dingens AS, Loes AN, Malone KD, Wolf CR, Chu HY, Tortorici MA, Velesler D, Murphy M, Pettie D, King NP, Balazs AB, Bloom JD. 2020. Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays. *Viruses* 12: 513.
- Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, Knoblauch A, Will C, Wixler V, Ludwig S. 2006. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduct.* 6: 179-184.
- Fontanet A, Cauchemez S. 2020. COVID-19 herd immunity: where are we? *Nat. Rev. Immunol.* 20:583-584.
- Hiriart Y, Pardo R, Bukata L, Lauché C, Muñoz L, Colonna M, Goldbaum F, Sanguineti S, Zylberman V. 2018. Development of a product anti-Shiga toxin for prevention of the hemolytic uremic syndrome. *Medicina (B. Aires)* 78: 107-112.
- Huang X, Hartley A-V, Yin Y, Herskowitz JH, Lah JJ, Ressler KJ. 2013. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. *J. Virol. Methods* 193: 270-277.
- Johnson MC, Lyddon TD, Suarez R, Salcedo B, LePique M, Graham M, Ricana C, Robinson C, Ritter DG. 2020. Optimized Pseudotyping Conditions for the SARS-COV-2 Spike Glycoprotein. *J. Virol.* 94: e01062-20.
- Mendoza-Pinto C, García-Carrasco M, Munguía Realpozo P, Méndez-Martínez S. 2021. Opciones terapéuticas en el manejo de la COVID-19 grave: una perspectiva de Reumatología. *Reumatol. Clin.* 17: 431-436.
- Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, Zhang L, Nie L, Qin H, Wang M, Lu Q, Li X, Sun Q, Liu J, Fan C, Huang W, Xu M, Wang Y. 2020. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nat. Protoc.* 15: 3699-3715.
- Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, Lamers MM, Sikkema RS, de Bruin E, Chandler FD, Yazdanpanah Y, Le Hingrat Q, Descamps D, Houhou-Fidouh N, Reusken CBEM, Bosch B-J, Drosten C, Koopmans MPG, Haagmans BL. 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg. Infect. Dis.* 26: 1478-1488.
- Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He W, Limbo O, Smith C, Song G, Woehl J, Yang L, Abbott RK, Callaghan S, Garcia E, Hurtado J, Parren M, Peng L, Ramirez S, Ricketts J, Ricciardi MJ, Rawlings SA, Wu NC, Yuan M, Smith DM, Nemazee D, Teijaro JR, Voss JE, Wilson IA, Andrabi R, Briney B, Landais E, Sok D, Jardine JG, Burton DR. 2020. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science* 369: 956-963.
- Seidman CE, Struhl K, Sheen J, Jessen T. 2001. Introduction of Plasmid DNA into Cells. En: *Current Protocols in Molecular Biology*. Chapter 1:Unit1.8. Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, Vanderheiden A, Nyhoff L, Davis CW, Adekunle O, Affer M, Sherman M, Reynolds S, Verkerke HP, Alter DN, Guarner J, Bryksin J, Horwath MC, Arthur CM, Saakadze N, Smith GH, Edupuganti S, Scherer EM, Hellmeister K, Cheng A, Morales JA, Neish AS, Stowell SR, Frank F, Ortlund E, Anderson EJ, Menachery VD, Roupael N, Mehta AK, Stephens DS, Ahmed R, Roback JD, Wrarmert J. 2020. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Reports Med.* 1: 100040.
- Vanderheiden A, Edara VV, Floyd K, Kauffman RC, Mantus G, Anderson E, Roupael N, Edupuganti S, Shi P, Menachery VD, Wrarmert J, Suthar MS. 2020. Development of a Rapid Focus Reduction Neutralization Test Assay for Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.* 131: e116.
- von Rhein C, Scholz T, Henss L, Kronstein-Wiedemann R, Schwarz T, Rodionov R, Corman V, Tonn T, Schnierle B. 2021. Comparison of potency assays to assess SARS-CoV-2 neutralizing antibody capacity in COVID-19 convalescent plasma. *J. Virol. Methods.* 288: 114031.
- 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. *Front Cell Infect Microbiol.* 10: 587269.
- Yang S, Zhou X, Li R, Fu X, Sun P. 2017. Optimized PEI-based Transfection Method for Transient Transfection and Lentiviral Production. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 9: 147-157.
- Zylberman V, Sanguineti S, Pontoriero A V, Higa S V, Cerutti ML, Seijo SMM, Pardo R, Muñoz L, Acuña Intriari ME, Alzogaray VA, Avaro MM, Benedetti E, Berguer PM, Bocanera L, Bukata L, Bustelo MS, Campos AM, Colonna M, Correa E, Cragnaz L, Dattero ME, Dellafiore M, Foscaldi S, González J V, Guerra LL, Klinke S, Labanda MS, Lauché C, López JC, Martínez AM, Otero LH, Peyric EH, Ponziani PF, Ramondino R, Rinaldi J, Rodríguez S, Russo JE, Russo ML, Saavedra SL, Seigelchifer M, Sosa S, Vilaríño C, López Biscayart P, Corley E, Spatz L, Baumeister EG, Goldbaum FA, Virois S. 2020. Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in argentina. *Medicina (B. Aires)* 80: 1-6.