

Evasión inmune por la variante de preocupación B.1.427 / B.1.429 del SARS-CoV-2

Matthew McCallum^{1†}, Jessica Bassi^{2†}, Anna De Marco^{2†}, Chen^{3†}, Alexandra C. Walls^{1 †}, Julia Di Iulio³, Alejandra Tortorici¹, Mary-Jane Navarro¹, Chiara Silacci-Fregni², Christian Saliba², Kaitlin R. Sprouse¹, Maria Agostini³, Dora Pinto², Katja Culap², John E. Bowen¹, Sasha W Tilles⁴, Matteo Samuele Pizzuto², Sonja Bernasconi Guastalla⁵, Laura E. Rosen³, Gyorgy Snell³, Amalio Telenti³, Herbert W. Virgin³, Luca Piccoli,^{2*} Davide Corti^{2*}, David Veesler.^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Universidad de Washington, Seattle, WA 98195, Estados Unidos, ²Humabs Biomed SA, una subsidiaria de Vir Biotechnology, 6500 Bellinzona, Suiza, ³Vir Biotechnology, San Francisco, CA 94158, Estados Unidos, ⁴Centro de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes, División de Alergias y Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, Seattle, WA 98195, Estados Unidos, ⁵Médico independiente, 6828 Balerna, Suiza, ⁶Unidad de Investigación Clínica, Clinica Luganese Moncucco, 6900 Lugano, Suiza.

Science, DOI: [10.1126 / science.abi7994](https://doi.org/10.1126/science.abi7994), 1 de julio, 2021.

Resumen

Una nueva variante de preocupación (VOC) llamada CAL.20C (B.1.427 / B.1.429), originalmente detectada en California, porta 3 mutaciones de la glicoproteína de pico, S13I en el péptido señal, W152C en el dominio N-terminal (NTD, N-terminal domain), y L452R en el dominio de unión al receptor (RBD, receptor binding domain).

El plasma de los individuos vacunados con una vacuna a ARNm, basada en el aislamiento de Wuhan-1, o de individuos convalecientes que exhibieron anticuerpos neutralizantes, redujo 2 a 3.5 veces su capacidad de neutralización contra la variante B.1.427 / B.1.429, en relación con los pseudovirus de tipo salvaje.

La mutación L452R redujo la actividad neutralizante de 14 de los 34 anticuerpos monoclonales específicos del RBD.

Las mutaciones S13I y W152C dieron como resultado una pérdida total de la neutralización para 10 de los 10 anticuerpos monoclonales específicos del NTD, ya que el super sitio antigénico del NTD fue remodelado por un cambio del sitio de escisión del péptido señal, y la formación de un nuevo enlace disulfuro, como lo reveló la espectrometría de masas en estudios estructurales.

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es causada por el SARS-CoV-2 y está asociada con el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), así como con complicaciones extrapulmonares como trombosis vascular, coagulopatía y un síndrome hiperinflamatorio que contribuye a la gravedad y mortalidad de la enfermedad.

El SARS-CoV-2 infecta las células diana utilizando la glicoproteína de pico (S), que está organizada como un homotrímero, con cada monómero que comprende una subunidad S1 y una S2 (1, 2). La subunidad S1 alberga el dominio de unión al receptor (RBD) y el dominio N-terminal (NTD), así como otros 2 dominios designados aquí como C y D (3, 4). El RBD interactúa con el receptor de entrada en las células huéspedes, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), a través de un subconjunto de aminoácidos que forman el motivo de unión al receptor (RBM) (1, 2, 5-7). Se sugirió que el NTD se une a DC-SIGN, L-SIGN y AXL, que pueden actuar como receptores de unión (8, 9).

Tanto el RBD como el NTD, son el objetivo de los anticuerpos neutralizantes, en los individuos infectados o vacunados, y de un subconjunto de anticuerpos monoclonales específicos del RBD que se están evaluando actualmente en los ensayos clínicos, o que están autorizados para su uso en los pacientes con COVID-19 (10-24).

La subunidad S2 es la maquinaria de fusión que une las membranas virales y del huésped para iniciar la infección, y es el objetivo de la reacción cruzada de anticuerpos con múltiples subgéneros de coronavirus, debido a su mayor conservación de la secuencia, en comparación con la subunidad S1 (25-28).

La propagación mundial en curso del SARS-CoV-2 condujo a la fijación de la sustitución D614G (29, 30), así como al surgimiento de una gran cantidad de linajes virales en todo el mundo, incluidas varias variantes preocupantes (VOC). Específicamente, los linajes B.1.1.7, B.1.351 y P.1 que se originaron en el Reino Unido, Sudáfrica y Brasil, respectivamente, se caracterizan por la acumulación de mutaciones en el gen S, así como en otros genes (31-33). Algunas de estas mutaciones conducen a reducciones significativas en la potencia de neutralización de varios anticuerpos monoclonales, de sueros convalecientes y de los anticuerpos inducidos por Pfizer / BioNTech BNT162b2 o Moderna mRNA-1273 (19, 34-40).

La variante B.1.1.7 se ha vuelto dominante en todo el mundo debido a su mayor transmisibilidad (33), lo que subraya la importancia de estudiar y comprender las consecuencias de los cambios antigénicos del SARS-CoV-2.

Resultados

La incidencia de los linajes B.1.427 / B.1.429 está aumentando rápidamente

La variante del SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 se informó por primera vez a principios de 2021 en California, y hasta mayo de 2021, se ha detectado en 34 países adicionales (41,42). Ambos linajes, B.1.427 y B.1.429 (pertenecientes al clado 20C, según la designación de Nextstrain) comparten las mismas mutaciones S (S13I, y W152C en el NTD y L452R en el RBD), pero albergan mutaciones diferentes en otros genes del SARS-CoV-2 (42).

El análisis del reloj molecular sugiere que el progenitor de ambos linajes surgió en mayo de 2020, divergiendo para dar lugar a los linajes B.1.427 y B.1.429 en junio-julio del 2020 (42). El rápido aumento en el número de casos asociados con los linajes B.1.427 / B.1.429 llevó a su clasificación como VOC por el CDC de los Estados Unidos.

(<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/casos-actualizaciones/variante-vigilancia/variante-info.html>).

Al 30 de abril de 2021, se informaron 8.441 y 21.072 genomas secuenciados en GISAID para los linajes B.1.427 y B.1.429, respectivamente. Esta VOC se detectó en California y en otros

estados de los Estados Unidos, y más recientemente en 34 países adicionales en todo el mundo (**Figura 1, A hasta H, y tabla S1**). El número de secuencias del genoma B.1.427 / B.1.429 depositadas aumentó rápidamente después de diciembre del 2020, con una incidencia superior al 50% en California desde febrero de 2021 (**Figura 1, B a E**).

En conjunto, este análisis ilustra el aumento de la incidencia de la VOC B.1.427 / B.1.429, y su propagación geográfica progresiva desde California a otros estados de Estados Unidos y otros países, lo cual es consistente con un estudio reciente que sugiere una mayor transmisibilidad en relación con el aislado ancestral (42).

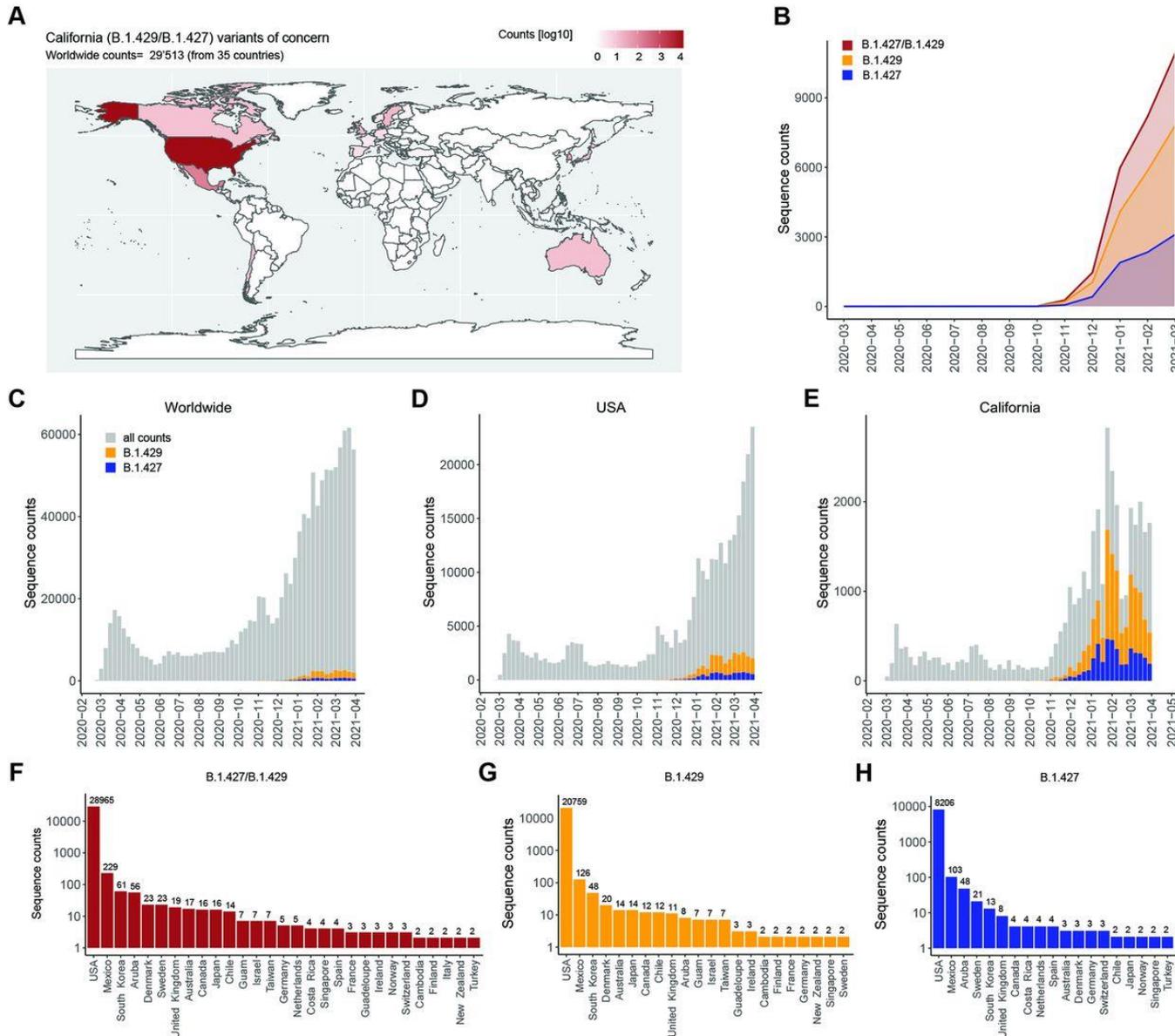


Figura 1. Distribución geográfica y evolución de la incidencia en el tiempo del COV SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429. (A) Mapa mundial que muestra la distribución geográfica y los recuentos de secuencias de la VOC B.1.427 / B.1.429 al 30 de abril del 2021. (B) Recuentos de secuencia de la VOC acumulativos e individuales B.1.427 / B.1.429 por mes. (C a E) Número total de secuencias de SARS-CoV-2 (gris) y B.1.427 / B.1.429 VOC (azul / naranja) depositadas mensualmente en todo el mundo (C), en los Estados Unidos (D) y en California (E). (F a H) Número total de secuencias B.1.427 / B.1.429 (F), B.1.427 (G) y B.1.429 (H) depositadas por país al 30 de abril de 2021. Solo se muestran los países con n≥2 secuencias depositadas.

La proteína S de la VOC B.1.427 / B.1.429 reduce la sensibilidad a los anticuerpos provocados por las vacunas

Para evaluar el impacto de las 3 mutaciones presentes en la glicoproteína S de B.1.427 / B.1.429 S sobre la neutralización, primero comparamos lado a lado la potencia de neutralización de los anticuerpos inducidos por las vacunas de ARNm contra la proteína S de los pseudovirus G614 S y B.1.427 / B.1.429.

Utilizamos plasma de 15 personas que recibieron 2 dosis de la vacuna Moderna mRNA-1273, y de 15 personas que recibieron 2 dosis de la vacuna Pfizer / BioNtech BNT162b2, recolectado entre 7 y 27 días después de la inmunización de refuerzo (**tabla S2**). Todos los vacunados tenían una actividad neutralizante del plasma sustancial contra los virus del pseudotipo G614 del SARS-CoV-2.

Usando un sistema de pseudotipado del virus de la leucemia murina (MLV), los títulos de media geométrica (GMT, geometric mean titer) mostraron que la potencia de neutralización promedio del plasma provocada por la vacuna mRNA1273 de Moderna se redujo 2.4 veces para B.1.427 / B.1.429 S (GMT: 178), en comparación a G614 S (GMT: 424) (**Figuras 2, A y B; figuras S1 y S2; y tabla S3**), mientras que se redujo 2,3 veces con el plasma obtenido de las personas vacunadas con Pfizer / BioNtech BNT162b2 (B.1.427 / B.1.429 GMT: 78 versus G614 GMT: 182) (**Figura 2, C y D; figuras S1 y S2; y tabla S3**).

Usando un sistema de pseudotipado del virus de la estomatitis vesicular (VSV), observamos una reducción promedio de 2.2 veces de la actividad neutralizante del plasma provocada por la vacuna mRNA1273 de Moderna contra B.1.427 / B.1.429 (GMT: 213) en comparación con el pseudovirus de G614 (GMT: 464) (**Figuras 2, E y F; figuras S1 y S2; y tabla S3**), y una reducción promedio de 2.5 veces de la actividad neutralizante del plasma provocada por la vacuna de Pfizer / BioNtech BNT162b2 contra B.1.427 / B.1.429 (GMT: 113) en comparación con los pseudovirus del G614 (GMT: 285) (**Figuras 2, G y H; figuras S1 y S2; y tabla S3**).

También analizamos el plasma de 18 individuos, 5 de los cuales habían estado previamente infectados con SARS-CoV-2 del tipo salvaje, que recibieron 2 dosis de la vacuna Pfizer / BioNtech BNT162b2, y cuyas muestras se recolectaron entre 14 y 28 días después de la inmunización de refuerzo. Comparamos la potencia de neutralización de los anticuerpos provocados por la vacuna de Pfizer / BioNtech BNT162b2, con los virus pseudotipados de la VSV con S de D614, B.1.427 / B.1.429, B.1.1.7, B.1.351 y P.1, que utilizan Vero E6 TMPRSS2 como células diana.

La potencia de neutralización del plasma se redujo 2,9 veces para B.1.427 / B.1.429 (GMT: 197) en comparación con D614 (GMT: 570), que es una disminución comparable a la observada con B.1.351 (GMT: 180, 3,2 veces) y mayor que la observada con virus los pseudotipados de B.1.1.7 y P.1 (GMT: 450 y 330, reducción de 1,3 y 1,7 veces, respectivamente) (**Figuras 2, I y J; figuras S1 y S2; y tabla S3**).

Estos datos indican que las 3 sustituciones de residuos de B.1.427 / B.1.429 S conducen a una reducción modesta pero significativa de la potencia de neutralización de los anticuerpos provocados por las vacunas.

También analizamos el plasma de 9 donantes convalecientes, que experimentaron COVID-19 sintomático a principios del 2020 (y, en consecuencia, probablemente estuvieron expuestos a la cepa Wuhan-1 o un a un virus del SARS-CoV-2 estrechamente relacionado), recolectadas 15 a 28 días después del inicio de los síntomas (**tabla S2**). La potencia de neutralización del plasma de 9 donantes convalecientes se redujo 3.4 veces para B.1.427 / B.1.429 S (GMT: 70) en comparación con G614 S (GMT: 240), similar a lo que observamos con los virus

pseudotipados de B.1.351 (4,4- veces, GMT: 55) y P.1 (3,3 veces, GMT: 72), mientras que la neutralización de B.1.1.7 se vio menos afectada (1,9 veces, GMT: 127) (**Figuras 2, K y L; figuras S1 y S2; y tabla S3**). En varios casos, se encontró que el nivel de actividad neutralizante contra las VOC estaba por debajo del límite de detección.

Estos hallazgos muestran que las 3 mutaciones presentes en la glicoproteína S de B.1.427 / B.1.429 disminuyen la actividad neutralizante de los anticuerpos provocados por la vacuna y por la infección, lo que sugiere que estas sustituciones de residuos, que definen el linaje, están asociadas con la evasión inmune. Sin embargo, estos datos también subrayan la mayor calidad de las respuestas de anticuerpos inducidos por la vacunación en comparación con la infección y su mayor resistencia a las mutaciones encontradas en VOC.

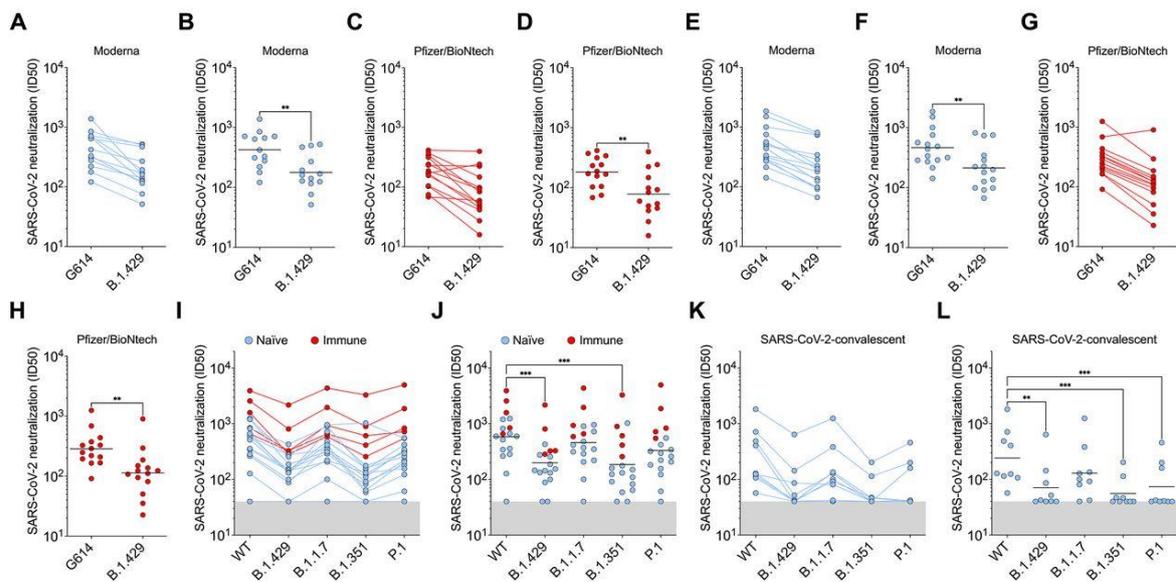


Figura 2. Neutralización del virus pseudotipado de B.1.427 / B.1.429 S por plasma de convalecencia y por los anticuerpos inducidos por la vacuna COVID-19. (A, B, E y F) Los títulos de anticuerpos neutralizantes (ID₅₀) se muestran como pares conectados [(A) y (E)] o el título medio geométrico, GMT [(B) y (F)] contra MLV [(A) y (B)] o VSV [(E) y (F)] de los virus pseudotipados que albergan S de G614 o de B.1.427 / B.1.429 (B.1.429), determinado usando plasma de individuos que recibieron 2 dosis de la vacuna Moderna mRNA-1273 (azul).

(C, D, G y H) Los títulos de anticuerpos neutralizantes (ID₅₀) se muestran como pares conectados [(C) y (G)] o el título medio geométrico, GMT [(D) y (H)] contra MLV [(C) y (D)] o VSV [(G) y (H)] de los virus pseudotipados que albergan S de G614 o B.1.427 / B.1.429 (B.1.429), determinado usando plasma de individuos que recibieron 2 dosis de la vacuna de ARNm de Pfizer / BioNtech BNT162b2 (rojo).

(I y J) Títulos de anticuerpos ID₅₀ (I) y GMT (J) neutralizantes frente a virus pseudotipados del VSV que albergan S de D614, B.1.427 / B.1.429, B.1.1.7, B.1.351, o P.1, determinado usando plasma de individuos sin experiencia (azul) y personas previamente infectadas (rojo) que recibieron 2 dosis de la vacuna de ARNm BNT162b2 de Pfizer / BioNtech.

Naïve: individuos vacunados que no habían sido previamente infectados con SARS-CoV-2.

Immune: individuos vacunados que habían sido previamente infectados con SARS-CoV-2. (K y L) Títulos de anticuerpos ID₅₀ (K) y GMT (L) neutralizantes frente a virus pseudotipados del VSV que albergan S de D614, B.1.427 / B.1.429, B.1.1.7, B.1.351 o P.1, determinado usando plasma de individuos convalescientes que fueron infectados con SARS-CoV-2 del tipo salvaje. Los datos de neutralización mostrados en (A) a (H) y (I) a (L) se realizaron usando 293T-ACE2 y VeroE6-TMPRSS2, respectivamente. Los datos son un promedio de n = 2 repeticiones.

Las mutaciones en S de B.1.427 / B.1.429 reducen la sensibilidad a los anticuerpos específicos de los sitios RBD y NTD

Para evaluar la contribución de las sustituciones de RBD y NTD a la reducción de la potencia de neutralización de los sueros de los vacunados y del plasma convaleciente, comparamos la actividad neutralizante de 34 anticuerpos monoclonales del RBD y 10 anticuerpos monoclonales del NTD, contra la variante S de D614 o de B.1.427 / B.1.429, utilizando un Sistema de pseudotipado de VSV (1, 43).

El panel de anticuerpos monoclonales específicos de RBD (incluidos los 6 anticuerpos monoclonales de uso clínico) reconoce distintos sitios antigénicos, como se caracterizó previamente (10, 11, 13, 20, 44, 45). Brevemente, los epítomos abarcan el RBM (sitios antigénicos Ia y Ib), un sitio antigénico críptico II, el sitio antigénico IV expuesto, que contiene glucano N343, y un segundo sitio antigénico críptico V (10, 11). Un total de 14 de 34 anticuerpos monoclonales mostraron una potencia de neutralización reducida al comparar los pseudovirus con S de B.1.427 / B.1.429 S y D614 (**Figuras 3, A hasta C, y Figura S3**).

Teniendo en cuenta los 6 anticuerpos monoclonales en uso clínico: regdanvimab (CT-P59) y, en menor medida, etesevimab (LY-CoV016), mostraron una reducción en la potencia de neutralización, mientras que bamlanivimab (LY-CoV555) perdió por completo su actividad neutralizante. La neutralización mediada por el cóctel de anticuerpos monoclonales casirivimab / imdevimab (REGN10933 y REGN10987) (14, 15), y por VIR-7831 (derivado de S309, recientemente rebautizado como sotrovimab) (10, 23, 24), no se ve afectada por la proteína S de la variante B.1.427 / B.1.429.

Para abordar el papel de la mutación L452R en el escape de neutralización de anticuerpos monoclonales específicos del dominio RBD, probamos la unión de los 34 anticuerpos monoclonales específicos del RBD y de las mutantes de RDW WT y L452R mediante interferometría de biocapa (**figura S4**). Los 10 anticuerpos monoclonales específicos del RBD que experimentaron una reducción de 10 veces o más en la potencia de neutralización de la variante S del B.1.427 / B.1.429, en relación con D614, se unieron pobremente a la mutante L452R del RBD, lo que demuestra un papel directo de esta mutación en la evasión de la respuesta inmune. Encontramos que la actividad neutralizante de los 10 anticuerpos monoclonales específicos de sitio NTD probados se abolió como resultado de la presencia de las mutaciones S13I y W152C (**Figuras 3, D a F**). Estos datos indican que la potencia disminuida de neutralización de la variante B.1.427 / B.1.429 resulta de la evasión de la neutralización mediada por anticuerpos monoclonales específicos de los dominios RBD y NTD.

Encontramos que la actividad neutralizante de los 10 anticuerpos monoclonales específicos del NTD probados, se abolió como resultado de la presencia de las mutaciones S13I y W152C (**Figuras 3, D a F**). Estos datos indican que la potencia disminuida de neutralización de la variante B.1.427 / B.1.429 resulta de la evasión de la neutralización mediada por anticuerpos monoclonales específicos de los dominios RBD y NTD.

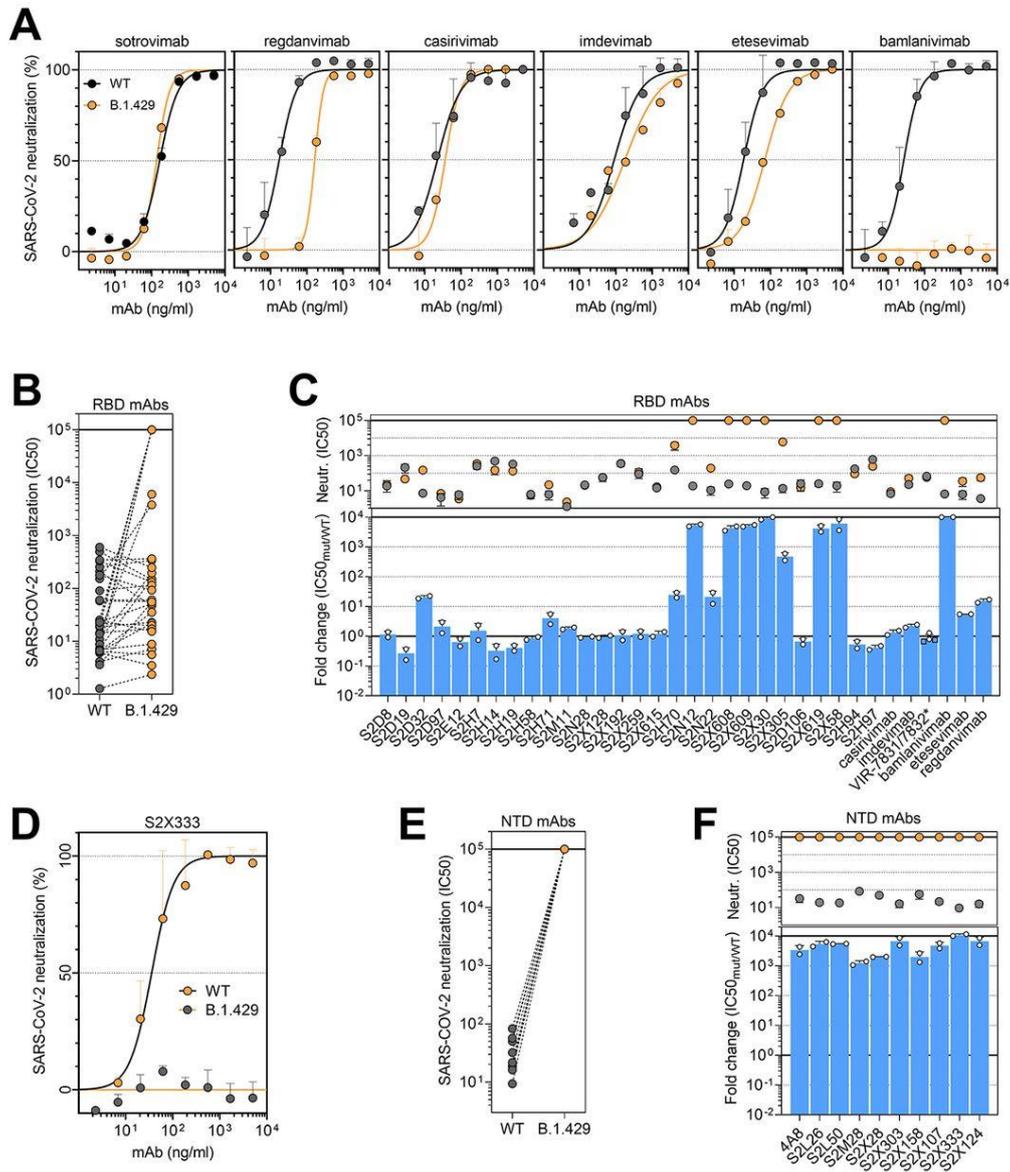


Figura 3. Neutralización mediante un panel de anticuerpos monoclonales específicos de los dominios RBD y NTD contra los pseudovirus con la proteína S de SARS-CoV-2 D614 y B.1.427 / B.1.429 2.

(A y D) Neutralización del VSV pseudotipado del SARS-CoV-2 que lleva la proteína S de D614 (gris) o B.1.427 / B.1.429 (naranja) mediante los anticuerpos monoclonales del dominio RBD de uso clínico (A) y un anticuerpo monoclonal dirigido al dominio NTD (S2X333) (D). Los datos son representativos de $n = 2$ repeticiones.

(B y E) Neutralización de los pseudotipos de VSV con la proteína S de SARS-CoV-2 de D614 o B.1.427 / B.1.429, mediante 34 anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio RBD y 10 anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio NTD. Los datos son la media de los valores de concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) (ng / ml) de $n = 2$ experimentos independientes. Los títulos de IC_{50} no neutralizantes se fijaron en 10^5 ng / ml.

(C y F) La neutralización por anticuerpos monoclonales específicos del dominio RBD (C) y específicos del dominio NTD (G) se mostró como valores medios de IC_{50} (arriba) y cambio de veces el medio (abajo) para la proteína S de B.1.427 / B.1.429 (naranja) en relación con Pseudovirus VSV con proteína S de

D614G (gris). VIR-7831 es un derivado del anticuerpo monoclonal S309 (sotrovimab). *, VIR-7832 (variante de VIR-7831 que lleva las mutaciones LS-GAALIE Fc), se muestran como cuadrados. Los títulos de CI_{50} no neutralizantes y el cambio de veces se establecieron en 10^5 ng / ml y 10^4 , respectivamente.

Caracterización estructural del trímero S del SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429

Para visualizar los cambios en la proteína S de SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 que contribuyen a la evasión inmune, determinamos una estructura por crióEM (crio- microscopía electrónica) del ectodominio trimérico de la variante S (que lleva las mutaciones HexaPro (46)) unido al dominio RBD específico del anticuerpo monoclonal S2M11 y del anticuerpo monoclonal S2L20 específico del sitio NTD, a una resolución de 2,3 Å (**figura 4A, figura S5 y tabla S4**). Se usó el anticuerpo S2M11 para bloquear los RBD en el estado cerrado (**Figura 4B**) mientras que el S2L20 se usó para estabilizar los NTD (**Figura 4C**) (12, 13). La superposición de las estructuras del RBD de la proteína S del SARS-CoV-2 unidas a regdanvimab- (CT-P59) y bamlanivimab- (LY-CoV-2) de B.1.427 / B.1.429 revela que el L452R introducido es estéricamente incompatible con la unión de estos anticuerpos monoclonales (**Figura 4, D y E**), lo que justifica la amortiguación o pérdida de actividad neutralizante.

Posteriormente, usamos el refinamiento local para tener la dinámica conformacional del NTD y de S2L20 en relación con el resto de la proteína S, y obtuvimos una reconstrucción por crióEM de la NTD unida a S2L20, a una resolución de 3.0 Å (**Figura 4C, Figura S5 y tabla S4**). La estructura revela que el super sitio antigénico NTD de B.1.427 / B.1.429 está severamente alterado. El extremo N está desordenado hasta el residuo 27, al igual que la horquilla β del super sitio (desordenado entre los residuos 137-158), y el bucle del super sitio (desordenado entre los residuos 243-264) (**Figura 4F**). Estos cambios estructurales explican la derogación de la unión y neutralización del panel de los anticuerpos monoclonales específicos del sitio NTD evaluado.

La superposición de una estructura RBD del SARS-CoV-2 unida al ACE2, con la estructura de S de la variante B.1.427 / B.1.429 muestra que el residuo R452 apunta hacia afuera y que no entra en contacto con ACE2, lo que sugiere que esta sustitución no afectaría la participación del receptor (**Figura 4G**). A continuación, evaluamos la unión del ectodominio de la ACE2 humana monomérico al RBD de B.1.427 / B.1.429 inmovilizados y del tipo salvaje, utilizando resonancia de plasmón de superficie (**figuras S6, A y B, y tabla S5**), interferometría de biocapa (**figuras S6, C a E, y tabla S5**) así como la unión del RBD de B.1.427 / B.1.429, B.1.1.7 y del tipo salvaje a la ACE2 humana inmovilizada mediante ELISA (**figura S6F y tabla S5**).

Nuestros resultados indican que los RBD de B.1.427 / B.1.429 y del tipo salvaje se unieron a la ACE2 con afinidades comparables (mientras que el B.1.1.7 RBD tenía una afinidad notablemente mayor por ACE2 (34)), validando las observaciones estructurales.

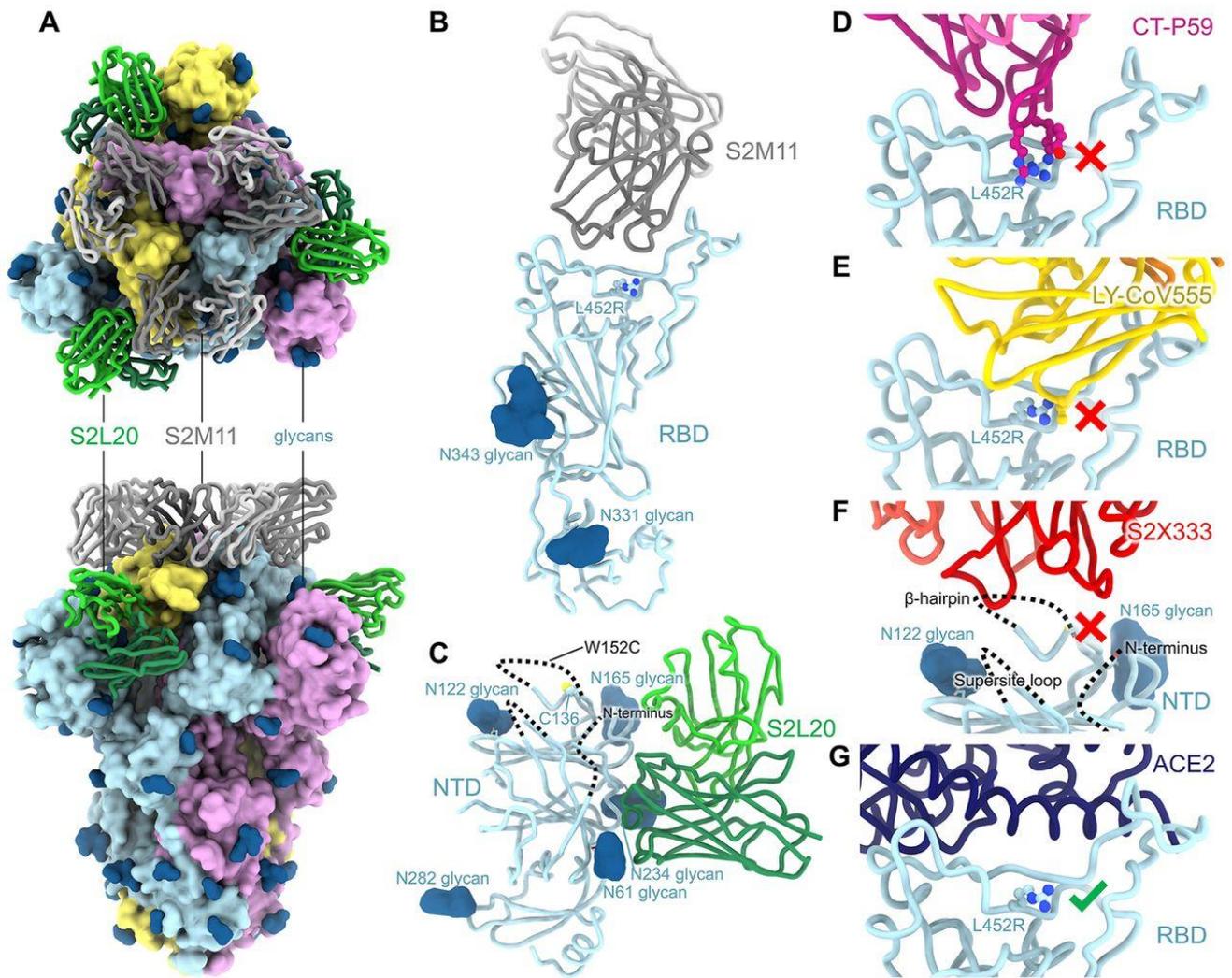


Figura 4. Estructura CryoEM del ectodominio trimérico del SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429.

(A) Estructura del trímero S (renderizado de superficie) unido a los anticuerpos monoclonales (cintas) S2M11 y S2L20, en 2 orientaciones ortogonales. Los protómeros de la proteína S del SARS-CoV-2 son de color rosa, cian y dorado, mientras que las cadenas ligeras y pesadas de S2L20 Fab son de color verde oscuro y claro, respectivamente, y las cadenas pesadas y ligeras de S2M11 Fab son de color oscuro y gris claro, respectivamente. Solo los dominios de variables Fab se resuelven en el mapa. Los glicanos ligados a N se representan como esferas de color azul oscuro.

(B) Vista ampliada del RBD vinculado a S2M11 con R452 mostrado en representación de bola y palo.

(C) Ampliación de la vista del sitio NTD unida a S2L20 con el extremo N desordenado, la horquilla β del super sitio y las regiones de bucle que se muestran como líneas discontinuas.

(D) La superposición de la estructura del RBD del SARS-CoV-2 unido a CT-P59 (PDB 7CM4) en la estructura por crióEM de la proteína S SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 muestra que el R452 chocaría estéricamente con el anticuerpo monoclonal. **(E)** La superposición de la estructura RBD del SARS-CoV-2 unido a LY-CoV555 (PDB 7KMG) en la estructura crióEM del SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 S muestra que L452R chocaría estéricamente con el mAb. **(F)** La superposición de la estructura S2X333 de SARS-CoV-2 S unida a S2X333 (PDB 7LXW) en la estructura crióEM de SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 S revela que la mayoría de los residuos del epítipo del super sitio antigénico NTD están desordenados.

(G) La superposición de la estructura del RBD del SARS-CoV-2 vinculada a ACE2 (PDB 7DMU) en la estructura por crióEM de la proteína S de SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 muestra que L452R apunta lejos de la interfaz con ACE2

Reordenamiento del enlace disulfuro en el super sitio antigénico NTD variante

B.1.427 / B.1.429

Para investigar más a fondo la base molecular de la pérdida de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales dirigidos al sitio NTD y los cambios estructurales en el dominio NTD, analizamos la unión de un panel de anticuerpos monoclonales específicos del NTD a las variantes recombinantes del NTD del SARS-CoV-2 usando ELISA. La mutación del péptido señal S13I amortiguó la unión de 5 anticuerpos monoclonales y anuló la unión de 5 anticuerpos monoclonales adicionales, de los 11 anticuerpos monoclonales neutralizantes evaluados (**Figuras 5A y S7**). Además, la mutación W152C redujo el reconocimiento de 6 anticuerpos monoclonales neutralizantes del NTD, incluida una pérdida completa de unión para dos de ellos, con un patrón complementario al observado para S13I (**Figuras 5A y S7**). La NTD de B.1.427 / B.1.429 S13I / W152C no se unió a ningún anticuerpo monoclonal neutralizante dirigido a NTD, que se sabe que se dirige a un único sitio antigénico (sitio antigénico i) (12), mientras que la unión del anticuerpo monoclonal S2L20 no neutralizante, al sitio antigénico iv de NTD, no se vio afectada por ningún mutante, lo que confirma la retención adecuada del plegamiento, como apoyan los datos estructurales (**Figuras 5A y S7**).

La unión del plasma provocado por la vacuna a los sitios mutantes del NTD confirmó y amplió estas observaciones con anticuerpos policlonales, mostrando una reducción cada vez más marcada en los títulos de unión debido a las sustituciones de residuos W152C, S13I y S13I / W152C (**Figuras 5B y S8**).

Anteriormente mostramos que la interrupción del enlace disulfuro C15 / C136 que conecta el extremo N con el resto del NTD, a través de la mutación del residuo o la alteración del sitio de escisión del péptido señal, anula la actividad neutralizante de los anticuerpos neutralizantes que se dirigen al super sitio antigénico NTD (sitio i) (12). Como la sustitución de S13I reside en el péptido señal y se prevé que cambie el sitio de escisión del péptido señal de S13-Q14 a C15-V16, planteamos la hipótesis de que esta sustitución afecta indirectamente a la integridad del sitio antigénico i del NTD, que comprende el extremo N. El análisis de espectrometría de masas de las variantes de NTD S13I y S13I / W152C confirmó que la escisión del péptido señal se produce inmediatamente después del residuo C15 (**Figuras 5, C a E**). Como resultado, C136, que de otro modo estaría unido por disulfuro a C15, se cisteinila en el S13I NTD debido a la presencia de cisteína libre en el medio de expresión (**Figura 5D y S9**). Asimismo, también se encontró que la mutación W152C, que introduce una cisteína libre, estaba cisteinilada en el W152C NTD (**Figura 5E**). No está claro si la cisteinilación se produciría durante la infección natural con mutantes S13I o W152C solas, o qué contribución juega la cisteinilación en la evasión inmune de las mutantes con S13I o W152C solos. En particular, la amortiguación de la unión del anticuerpo monoclonal neutralizante específico del sitio NTD es más fuerte para la mutante S13I que para el mutante S12P, que previamente mostramos que también desplaza el sitio de escisión del péptido señal a C15-V16 (**Figura 5A**). Por el contrario, no observamos ningún efecto sobre la unión de los anticuerpos monoclonales de la sustitución S12F, que también se ha detectado en aislamientos clínicos, de acuerdo con el hecho de que esta mutación no afectó al sitio de escisión del péptido señal nativo (es decir, ocurre en el S13 - Posición Q14), según lo observado por espectrometría de masas (**Figura 5G**). En ausencia del enlace disulfuro C15-C136, el extremo N ya no está engrapado al DTN, lo que coincide con los datos estructurales que muestran que el extremo N de la variante B.1.427 / B.1.429 se desordena en relación con el resto del DTN (**Figura 4C**).

Aunque las variantes del NTD S13I y W152C se cisteinilaron respectivamente en las posiciones C136 y W152C, el doble mutante S13I / W152C no estaba cisteinilado, lo que sugiere que C136 y W152C habían formado un nuevo enlace disulfuro. (**Figuras 5, D a F**). El análisis de espectrometría de masas en tándem de los péptidos digeridos no reducidos identificó los péptidos discontinuos enlazados que contenían C136 y W152C (**figura S9**), lo que confirma que se forma un enlace disulfuro entre C136 y W152C en la NTD S13I / W152C de la variante B.1.427 / B.1.429. W152C está en la horquilla β del super sitio antigénico, y la formación de un nuevo enlace disulfuro con C136 movería residuos en la horquilla $\beta > 20 \text{ \AA}$ y la estructura local de la horquilla β se desordenó en el B.1.427 / Variante B.1.429 (**Figura 4C**).

En conjunto, estos hallazgos demuestran que las mutaciones S13I y W152C encontradas en la proteína S de la variante B.1.427 / B.1.429 son conjuntamente responsables del escape de los anticuerpos monoclonales específicos del NTD, debido a la delección de los dos residuos N-terminales del SARS-CoV-2 S, y el reordenamiento general del super sitio antigénico NTD. Nuestros datos respaldan que el NTD del SARS-CoV-2 desarrolló un mecanismo compensatorio para formar un enlace disulfuro alternativo y que las mutaciones del péptido señal de S ocurren in vivo, en un entorno clínico para promover la evasión inmune. Por lo tanto, la variante de S del SARS-CoV-2 B.1.427 / B.1.429 se basa en una estrategia de neutralización-escape indirecta e inusual.

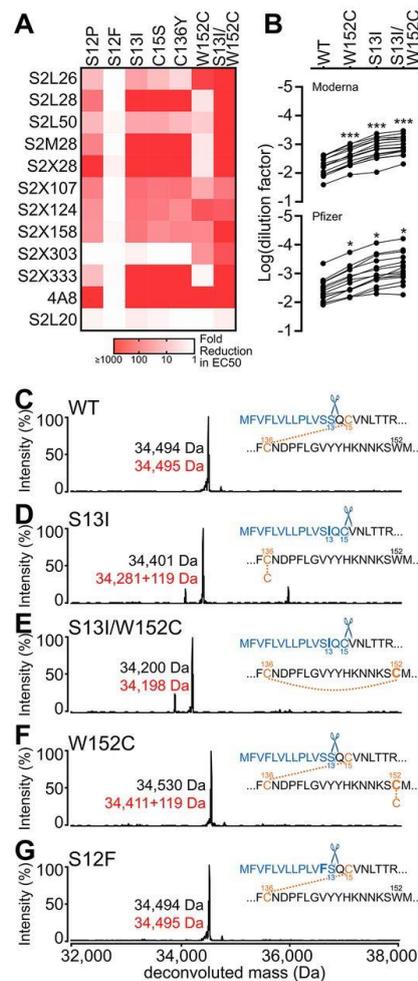


Figura 5. Las mutaciones S13I y W152C de la proteína S de B.1.427 / B.1.429 conducen a la evasión inmune.

(A) Unión de un panel de 11 anticuerpos monoclonales específicos del NTD neutralizantes (sitio antigénico i) y 1 no neutralizante (sitio antigénico iv) a variantes del NTD de SARS-CoV-2 recombinantes analizadas por ELISA mostradas como un mapa de calor.

(B) Unión de anticuerpos monoclonales plasmáticos de individuos vacunados a variantes del NTD de SARS-CoV-2 recombinantes analizadas por ELISA. El factor de dilución medio para cada mutante se comparó mediante la prueba ANOVA unidireccional con el tipo salvaje, lo que arrojó valores de $p < 0,05$ (*) y $< 0,001$ (**).

(C a G) Espectros de masas desenvueltas de construcciones de NTD purificadas, incluidos el NTD de tipo salvaje con el péptido señal nativo **(B)**, la NTD S13I **(C)**, la NTD S13I y W152C **(D)**, la NTD W152C **(E)** y el S12F NTD **(F)**. La masa empírica (negro) y la masa teórica (rojo) se muestran junto al pico correspondiente. Se observaron 119 Da adicionales para los NTD de S13I y W152C correspondientes a la cisteinilación del residuo de cisteína libre en estas construcciones (ya que L-cisteína estaba presente en el medio de expresión). El péptido señal escindido (texto azul) y la secuencia de residuos posterior (texto negro) también se muestran en base a los resultados de MS. Los residuos mutados se muestran en negrita. Las cisteínas se resaltan en naranja claro (a menos que estén en el péptido señal escindido) mientras que los enlaces disulfuro se muestran como líneas de puntos de color naranja claro entre las cisteínas. Los residuos están numerados como referencia.

Discusión

La actividad neutralizante del suero o del plasma es un correlato de la protección contra la exposición al SARS-CoV-2 en primates no humanos (47, 48) y el tratamiento con varios anticuerpos monoclonales neutralizantes ha reducido la carga viral y ha disminuido la hospitalización y la mortalidad en los ensayos clínicos (10, 14, 15, 22, 23, 49). La evasión inmune observada mediada por L452R de la proteína S de la variante B.1.427 / B.1.429 concuerda con los hallazgos previos de que esta sustitución redujo la actividad de unión o neutralización de algunos anticuerpos monoclonales, antes de la descripción de la variante B.1.427 / B.1.429 (50-53). La adquisición de la sustitución L452R por múltiples linajes en múltiples continentes, incluidos los linajes B.1.617.1 y B.1.617.2 que emergen en la India (54), sugiere una selección positiva, que podría resultar de la presión selectiva de anticuerpos neutralizantes específicos del RBD (55).

El NTD del SARS-CoV-2 sufre una rápida deriva antigénica y acumula un mayor número de mutaciones y deleciones en relación con otras regiones de la glicoproteína S (12, 56). Por ejemplo, la sustitución L18F y la deleción del residuo Y144 se encuentran en el 8% y el 26% de los genomas virales secuenciados y están presentes en los linajes B.1.351 / P.1 y el linaje B.1.1.7, respectivamente. Ambas mutaciones están asociadas con la reducción o abrogación de la unión y neutralización de los anticuerpos monoclonales (12, 34). El hallazgo de que múltiples variantes circulantes de SARS-CoV-2 se asignan al NTD, incluidas varias de ellas en el super sitio antigénico (sitio i), sugiere que el NTD está sujeto a una fuerte presión selectiva de la respuesta inmune humoral del huésped. Esto se apoya además en que la identificación del supersitio antigénico NTD está bajo presión inmunitaria del huésped.

De manera similar a cómo las mutaciones S13I / W152C facilitan la evasión de todos los anticuerpos monoclonales específicos de NTD probados, E484K causa una amplia resistencia a muchos anticuerpos monoclonales específicos de RBD. La adquisición independiente de la mutación E484K, en las variantes B.1.351, P.1, B.1.526 y más recientemente la variante B.1.1.7

(34) sugiere que esto también podría ocurrir en los linajes B.1.427 / B.1.429. De hecho, recientemente se han depositado en GISAID 4 secuencias del genoma con la mutación E484K RBD en la variante B.1.427. Alternativamente, las mutaciones S13I / W152C podrían surgir en cualquiera de estas variantes. Observamos que la mutación S13I se detectó recientemente en el linaje SARS-CoV-2 B.1.526, que se describió originalmente en Nueva York (62, 63). Comprender el nuevo mecanismo de evasión inmune de las variantes emergentes, como la modificación del péptido señal descrita en este documento, es tan importante como la propia vigilancia de la secuencia para contrarrestar con éxito la pandemia en curso.

Referencias

Ir a artículo original.

Traducción: Ramiro Heredia (ramiroherediamd@gmail.com)