

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario Biotecnología Clínica



ANÁLISIS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES FRENTE A SARS-COV-2 QUE BLOQUEAN LA INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR DC-SIGN

Autor: Laura Gómez-Cornejo Madrid

Tutor: Dr. Juan García-Bernalt Diego

Villaviciosa de Odón, 17 de julio de 2025

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Fin de Máster.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Rafael Delgado por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en un entorno científico tan estimulante y enriquecedor. Formar parte de su equipo ha sido una experiencia única, que me ha permitido crecer tanto a nivel académico como personal.

También quiero dar las gracias a mi tutor, Juan, por todo el tiempo que me ha dedicado y por haberme acompañado tan de cerca durante estos meses. Gracias por confiar en mí y permitirme avanzar con independencia, sabiendo siempre que podía contar con tu ayuda cuando lo necesitara.

Al mismo tiempo, gracias a Fátima, Gonzalo y Hugo por acogerme desde el primer día y por crear un ambiente de trabajo tan colaborativo, enriquecedor y, sobre todo, humano. Ha sido un verdadero placer compartir este tiempo con vosotros, y ojalá podamos seguir compartiéndolo al menos durante cuatro años más.

Quisiera también agradecer a la Fundación 12 de Octubre por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, facilitando los recursos necesarios y un entorno propicio para el desarrollo de esta investigación.

Por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia y a mis amigas.

A mi familia, por haber sido mi mayor apoyo a lo largo de todo este proceso, por darme la oportunidad de realizar este máster y por confiar en mí incluso cuando yo misma dudaba. Vuestro amor, paciencia y ánimo constante han sido fundamentales para que pudiera seguir adelante y alcanzar esta meta.

A mis amigas, gracias por haber estado siempre a mi lado, incluso en esos momentos en los que ni yo sabía cómo acompañarme. Es muy bonito ver cómo cada una va encontrando su camino, y me hace mucha ilusión que estéis aquí mientras yo encuentro el mío. Gracias por hacerlo todo más fácil, más ligero y mucho más bonito.

RESUMEN

El receptor DC-SIGN (CD209) ha sido propuesto como una vía alternativa de entrada para SARS-CoV-2, facilitando la infección en células que no expresan ACE2. Este Trabajo de Fin de Máster se centra en el análisis funcional de anticuerpos neutralizantes presentes en sueros de individuos vacunados y/o infectados, evaluando su capacidad para bloquear la interacción entre la proteína *Spike* y DC-SIGN.

Para ello, se optimizó un sistema experimental basado en pseudotipos virales que expresan proteína *Spike*, incluyendo una variante con la mutación puntual E484D, que permite evaluar la entrada viral de forma independiente de ACE2. El anticuerpo monoclonal Sotrovimab se utilizó como control positivo, demostrando una neutralización específica de la vía mediada por DC-SIGN.

El análisis de sueros de individuos naïve vacunados reveló una respuesta humoral centrada principalmente en la ruta ACE2, sin diferencias significativas frente a DC-SIGN. En cambio, en individuos con infección *breakthrough* se observó una tendencia a un mayor bloqueo de la vía DC-SIGN, lo que sugiere una posible diversificación del repertorio de anticuerpos inducida por la infección post-vacunal. Asimismo, se detectó una disminución general de la neutralización frente a variantes más divergentes, como BA.1 o JN.1, tanto en la vía ACE2 como en DC-SIGN.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la historia inmunitaria influye en la capacidad de neutralización no solo frente al receptor principal ACE2, sino también frente a vías alternativas. Además, el estudio valida un modelo experimental para evaluar esta ruta y resalta su potencial como objetivo terapéutico frente a variantes con evasión inmunitaria.

Palabras clave: SARS-CoV-2, DC-SIGN, ACE2, receptores alternativos, anticuerpos neutralizantes.

ABSTRACT

The DC-SIGN (D209) receptor has been proposed as an alternative entry pathway for SARS-CoV-2, facilitating infection in cells that do not express ACE2. This Master's Thesis is focused on the functional analysis of neutralising antibodies present in the sera from vaccinated and/or previously infected individuals, evaluating their ability to block the interaction between the Spike protein and DC-SIGN.

To explore this, an experimental system using pseudotyped viruses expressing the Spike protein was optimised, including a variant with E484D point mutation, which allows to evaluate viral entry independently of ACE2. The monoclonal antibody

Sotrovimab was used as a positive control, demonstrating specific neutralization of the DC-SIGN-mediated pathway.

Analysis of sera from naïve vaccinated individuals revealed a humoral response mainly focused on the ACE2 pathway, with no significant differences compared to DC-SIGN. In contrast, individuals with breakthrough infection showed a tendency towards greater blocking of the DC-SIGN pathway, suggesting a possible diversification of the antibody repertoire induced by post-vaccination infection. Additionally, a general decrease in neutralisation against more divergent variants, such as BA.1 or JN.1, was detected in both pathways.

These results support the hypothesis that immune history influences neutralisation capacity not only against the main ACE2 receptor but also against alternative pathways. Furthermore, the study validates an experimental model for evaluating this pathway and highlights its potential as a therapeutic target against variants with immune evasion.

Keywords: SARS-CoV-2, DC-SIGN, ACE2, alternative receptors, neutralizing antibodies.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. SARS-COV-2: INTRODUCCIÓN Y ARQUITECTURA VIRAL.....	7
1.1.1. ARQUITECTURA VIRAL	7
1.1.2. CONFORMACIONES “UP” AND “DOWN” DEL DOMINIO RBD.....	8
1.2. ACE-2 vs RECEPTORES ALTERNATIVOS	8
1.3. RECEPTORES TIPO LECTINA Y DC-SIGN	9
1.4. GLICOSILACIONES PRESENTES EN LA PROTEÍNA SPIKE.....	10
1.5. ANTICUERPOS FRENTE A SARS-COV-2 Y SUS CLASES.....	11
1.6. EVIDENCIAS DE NEUTRALIZACIÓN DE SARS-COV-2 DEPENDIENTES DE DC-SIGN.....	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. HIPÓTESIS.....	14
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1. LÍNEAS CELULARES	15
3.2. DISEÑO DE LA TOMA DE MUESTRAS.....	15
3.3. PRODUCCIÓN DE PSEUDOTIPOS DE SARS-COV-2 MEDIANTE TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA.....	16
3.4. NEUTRALIZACIÓN POR SOTROVIMAB, INFECCIÓN DIRECTA CON PSEUDOTIPOS BASADOS EN VSV	17
3.5. ENSAYO DE TRANSINFECCIÓN MEDIADO POR DC-SIGN Y L-SIGN CON PSEUDOTIPO SARS-COV-2 (614G-PNL4-3-LUC) Y NEUTRALIZACIÓN CON SOTROVIMAB.....	18
3.6. ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE SUEROS .	19
3.7. CARACTERIZACIÓN DE LA NEUTRALIZACIÓN FRENTE A VARIANTES DE SARS-COV-2 CON SUEROS AGRUPADOS POR PERFIL INMUNITARIO	19
3.8. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN E484D EN LA PROTEÍNA SPIKE MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	20
3.9. VALIDACIÓN DE UN MODELO DE INFECTIVIDAD ACE2-INDEPENDIENTE MEDIADA POR DC-SIGN	21
4. RESULTADOS	22

4.1. VALIDACIÓN DEL MODELO DE NEUTRALIZACIÓN MEDIADA POR DC-SIGN CON SOTROVIMAB	22
4.2. ANÁLISIS DE LA NEUTRALIZACIÓN POST-VACUNAL EN INDIVIDUOS NAÏVE: IMPACTO SOBRE EL RECEPTOR DC-SIGN	23
4.3. CONTRIBUCIÓN DE LA NEUTRALIZACIÓN RELATIVA MEDIADA POR DC-SIGN EN GRUPOS NAÏVE, BREAKTHROUGH Y REINFECCIONES .	24
4.4. PATRÓN DE NEUTRALIZACIÓN FRENTA A VARIANTES DE SARS-COV-2 SEGÚN PERFIL INMUNITARIO	25
4.5. VALIDACIÓN DE LA MUTACIÓN E484D Y ANÁLISIS FUNCIONAL EN MODELOS CELULARES TRANSFECTADOS CON DC-SIGN.....	26
5. <i>DISCUSIÓN</i>	27
5.1. OBJETIVOS DE SOSTENIBILIDAD	29
6. <i>CONCLUSIONES</i>	30
7. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SARS-COV-2: INTRODUCCIÓN Y ARQUITECTURA VIRAL

Desde la emergencia de la COVID-19 en diciembre de 2019, causado por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2 (SARS-CoV-2), el virus ha causado casi 800 millones de infecciones confirmadas y más de 7 millones de fallecimientos a nivel mundial, según datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Ante esta emergencia sanitaria surgió la necesidad de desarrollar vacunas eficaces capaces de controlar la propagación del virus y mitigar sus efectos clínicos. Gracias a los avances científicos y a una movilización internacional sin precedentes, se lograron diseñar, validar y distribuir vacunas que han demostrado ser altamente efectivas. Su implementación a gran escala no solo ha contribuido a reducir significativamente el número de contagios, sino también a disminuir de forma notable la incidencia de casos graves y hospitalizaciones, marcando un punto de inflexión en la evolución de la pandemia (Yadav et al., 2023).

Sin embargo, a lo largo de la evolución de la pandemia, el SARS-CoV-2 ha acumulado mutaciones que han dado lugar a la aparición de diversas variantes virales. Algunas de estas variantes han mostrado mayores tasas de transmisión, capacidad de evasión parcial del sistema inmunitario o diferencias en la eficacia de neutralización por anticuerpos inducidos por la infección o la vacunación (Abulsoud et al., 2023). Es por ello que la monitorización del virus y los avances en nuestro conocimiento del mismo siguen siendo de vital importancia.

1.1.1. ARQUITECTURA VIRAL

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de polaridad positiva que pertenece a la familia de *Coronaviridae* y al género de *Betacoronavirus*. La partícula viral está formada por diversas proteínas; de la nucleocápside (N), de membrana (M), de la envuelta (E) y la glicoproteína transmembrana o *Spike* (S) (Jackson et al., 2022).

La glicoproteína *Spike* es una proteína trimérica de fusión de clase I que media la entrada del virus en las células y está formada por dos subunidades asociadas no covalentemente; la subunidad S1, formada por el dominio N-terminal NTD y el dominio de unión al receptor (RBD) y, la subunidad S2 que ancla la proteína S a la membrana y media la fusión de membrana tras la infección de una nueva célula (Figura 1) (Fehr & Perlman, 2015; Jackson et al., 2022; Walls et al., 2020). En la conformación de prefusión, la subunidad S1 se pliega en cuatro dominios; RBD, NTD y dos dominios carboxi-

terminales (CTD1 y CTD2), mientras que la subunidad S2 envuelve esta estructura. En el estado post-fusión los cambios conformacionales provocan que la subunidad S1 se escinda de la S2, mientras que S2 forma un trímero estable y alargado (Jackson et al., 2022).

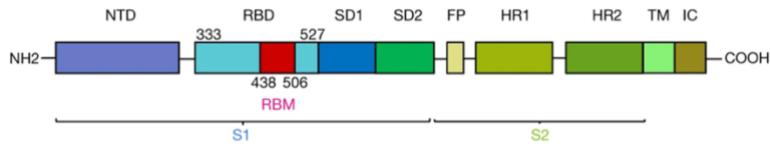


Figura 1. Esquema lineal de la proteína *Spike* (S) del SARS-CoV-2, con sus principales dominios funcionales: NTD, RBD (incluyendo RBM), SD1, SD2, FP, HR1, HR2, TM y CT, organizados desde el extremo N-terminal al C-terminal. Tomado de (Lan et al., 2020).

Al tratarse de la proteína responsable de la entrada viral, la *Spike* alberga una gran cantidad de mutaciones que se han ido acumulando con la aparición de las diferentes variantes. Estas modificaciones genéticas, han sido clave para comprender la dinámica del virus y continúan representando un desafío para el control de la pandemia (Abulsoud et al., 2023).

1.1.2. CONFORMACIONES “UP” Y “DOWN” DEL DOMINIO RBD

A su vez, el dominio RBD de la *Spike* puede adoptar dos conformaciones estructurales denominadas “up” (abierta) y “down” (cerrada). En la conformación “down” el RBD se encuentra parcialmente plegado y oculto por otras regiones de la *Spike*, lo que limita su accesibilidad al receptor. Esta disposición ayuda a mantener la proteína en un estado más estable y menos expuesto al sistema inmunitario.

Cuando el RBD cambia a la conformación “up” expone completamente su motivo de unión al receptor (RBM), facilitando la interacción con el receptor. Este cambio estructural es fundamental para que el virus pueda unirse eficazmente a las células y comenzar el proceso de infección (Jackson et al., 2022).

1.2. ACE-2 vs RECEPTORES ALTERNATIVOS

ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*) es una proteína transmembrana presente en la membrana celular de una diversidad de células epiteliales; neumocitos alveolares y algunas células epiteliales bronquiales y, actúa como el receptor principal de entrada de SARS-CoV-2 a las células (Gross et al., 2020).

La interacción entre la subunidad S1 de la glicoproteína *Spike* (S) del virus y ACE2 desencadena el procesamiento proteolítico de la proteína S por parte de proteasas de la célula huésped. Este evento permite que la subunidad transmembrana S2 medie la fusión

de la membrana viral con la membrana celular, lo que marca el inicio del proceso de infección. Dentro de S1, el dominio de unión al receptor (RBD) es el responsable directo de la interacción con ACE2, convirtiéndolo en una diana clave para la generación de anticuerpos neutralizantes tanto tras la infección como en respuesta a la vacunación (Arora et al., 2025).

Si bien ACE2 ha sido identificado como el receptor principal para la entrada del SARS-CoV-2, estudios recientes sugieren que no es el único elemento implicado en este proceso (Gupta et al., 2023). Existen receptores alternativos independientes de ACE2 como CD147, CD209L (L-SIGN), CD209 (DC-SIGN) o TMEM30A que pueden mediar la entrada de SARS-CoV-2. Esto resulta especialmente relevante considerando que algunas variantes emergentes, como Ómicron, presentan un tropismo celular diferente y utilizan vías de entrada alternativas (Lim et al., 2022). Por ello, estudiar el papel de estos receptores alternativos es fundamental para entender mejor la infección y la patogénesis del SARS-CoV-2, y podría abrir nuevas vías para prevenir y tratar la COVID-19 frente a variantes que escapan a la inmunidad conferida por las variantes ancestrales.

1.3. RECEPTORES TIPO LECTINA Y DC-SIGN

Una de las principales clases de receptores alternativos de SARS-CoV-2 son lectinas tipo c o CLRs (*c-lectin receptors*). Estos receptores están involucrados en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) basados en carbohidratos por células presentadores de antígenos. Entre los CLRs encontramos el receptor ya nombrado DC-SIGN o CD209, un receptor alternativo que se encuentra principalmente en células dendríticas y macrófagos alveolares y dérmicos (Gupta et al., 2023).

Gracias a ensayos previos realizados en nuestro laboratorio mediante infección directa y trans-infección con pseudovirus del virus de la estomatitis vesicular (VSV) presentando la *Spike* de SARS-CoV-2, se ha observado que estos receptores desempeñan un papel importante como receptores secundarios en el proceso de entrada viral, facilitando la infección y la difusión viral en presencia de ACE2 (Figura 2) (Thépaut et al., 2021).

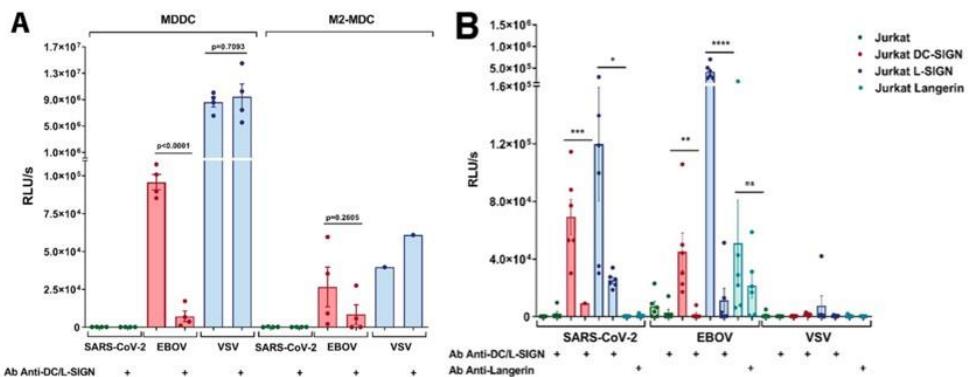


Figura 2. (A) Infección directa de células primarias: células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) y macrófagos M2 derivados de monocitos (M2-MDM) con pseudovirus SARS-CoV-2, EBOV-GP y VSV-G. En el caso de infección con pseudovirus SARS-CoV-2 no se observa infección directa. (B) Transinfección utilizando células Jurkat con o sin CLRs DC-SIGN, L-SIGN y Langerin con pseudoviriones de SARS-CoV-2, EBOV y VSV en células Vero E6. Cuando se produce la transinfección se observa un aumento de la infección relacionada con la contribución de DC-SIGN. Tomada de Thépaut et al., (2021).

Recientemente, se ha descrito una mutación puntual en la proteína *Spike* del SARS-CoV-2 (E484D) que modifica de manera significativa el tropismo celular del virus y su mecanismo de entrada (Arora et al., 2025). Esta mutación permite que el pseudovirus infecte células de forma independiente de ACE2, favoreciendo su internalización a través de receptores alternativos como DC-SIGN, ASGR1 y TMEM106B (Arora et al., 2025; Baggen et al., 2023).

Se ha observado que la sustitución del ácido glutámico por aspartato en la posición 484, localizada en el motivo de unión al receptor (RBM), altera la conformación del RBD, facilitando la interacción con lectinas tipo C expresadas en la superficie celular y promoviendo la entrada viral mediante mecanismos de endocitosis mediados por estas lectinas (Lim et al., 2022; Thépaut et al., 2021).

1.4. GLICOSILACIONES PRESENTES EN LA PROTEÍNA SPIKE

CLRs como DC-SIGN, detectan glicosilaciones en la superficie de los patógenos, particularmente N-glicosilaciones. Las N-glicosilaciones se dan en Asparraginas (N) que están enmarcadas dentro del motivo aminoacídico N-X-S/T (N=Asparagina, X=cualquier aminoácido excepto la prolina y S/T=Serina o Treonina) (Watanabe et al., 2020). La proteína *Spike* de SARS-CoV-2 contiene 22 sitios de N-glicosilación, 18 de ellos están conservados en el SARS-CoV, que causó el brote de 2002-2003 (Figura 3) (Walls et al., 2020).

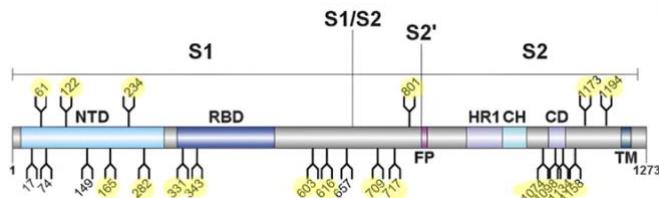


Figura 3. Representación esquemática de la *Spike* del SARS-CoV-2 con los puntos de N-glicosilación señalados. En amarillo están subrayados los puntos de glicosilación conservados en SARS-CoV y SARS-CoV-2. Modificada de (Watanabe et al., 2020).

Mutaciones puntuales que eliminan estos sitios de glicosilación han demostrado reducir la infectividad del virus (Walls et al., 2020; Zhang et al., 2021). La glicosilación

de proteínas virales no solo es crucial para un plegamiento y ensamblaje adecuados, también contribuye a la evasión del sistema inmunitario al proteger los epítopos virales antigenicos formando un escudo de glicanos.

La conservación de estos sitios de N-glicosilación entre diferentes variantes y coronavirus relacionados sugiere que cumplen una función esencial en la biología viral, lo que los convierte en posibles blancos terapéuticos estables frente a la variabilidad genética del virus. Además de proteger los epítopos virales del reconocimiento por anticuerpos, algunos glicanos presentes en la proteína *Spike* pueden actuar como ligandos para CLRs. Esto ocurre en el caso de DC-SIGN y L-SIGN, implicados en la unión y captura de otros virus como el VIH-1 y el SARS-CoV. Aunque la glicosilación del SARS-CoV-2 es más compleja y menos dependiente de manosa, una de las principales dianas de DC-SIGN, el posible papel de estas interacciones en la infección y diseminación viral continúa siendo de gran interés terapéutico (Hoffmann et al., 2021).

Por tanto, el patrón de N-glicosilación altamente conservado en la proteína *Spike* no solo es crítica para la infectividad y evasión inmunitaria del SARS-CoV-2, sino que también constituye un objetivo atractivo para el diseño de nuevas terapias. La inhibición de estas interacciones glicano-receptor, junto con el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra regiones glicosiladas conservadas, podría ofrecer estrategias efectivas para neutralizar el virus, incluso frente a futuras variantes.

1.5. ANTICUERPOS FRENTE A SARS-COV-2 Y SUS CLASES

Como se ha descrito previamente, la subunidad S1 de la proteína S presenta dos dominios importantes que son objetivos de anticuerpos monoclonales, NTD y RBD. La mayoría de los anticuerpos estudiados anti-SARS-CoV-2 se dirigen frente al RBD. Estos se pueden clasificar en función de su estructura en 4 clases:

- Clase 1: el epítopo al que se dirigen este tipo de anticuerpos que actúan frente a RBD se superpone con el motivo de unión al receptor (RBM) dentro del RBD. Por tanto, su mecanismo de neutralización se debe a que previenen que ACE2 se une a la proteína S, reconociendo únicamente la conformación “up” del RBD. Este tipo de anticuerpos han sido ampliamente observados en fases tempranas de la infección (Chen et al., 2023).
- Clase 2: los anticuerpos de clase 2 son similares a los de clase 1, pues también previenen la unión de ACE2 a la proteína S al actuar frente al RBM. Lo que tienen en particular es que se pueden unir a conformaciones tanto “up” como “down” de la proteína S.

- Clase 3: los anticuerpos pertenecientes a clase 3 se centran en un epítopo del RBD altamente conservado, pero independiente de ACE2, lo que los hace más resistentes a las mutaciones del virus. También pueden unirse al RBD en sus conformaciones “up” y “down”. La mayoría de los anticuerpos pertenecientes a esta clase han demostrado potentes actividades neutralizantes contra las variantes del SARS-CoV-2. Entre ellos se encuentran el S309, (nombre comercial Sotrovimab), que se usará como anticuerpo control en este trabajo. La interacción entre S309 y la proteína S interfiere con el residuo N343 de la *Spike*, una de las N-glicosilaciones consideradas clave para la interacción con DC-SIGN (Pinto et al., 2020).
- Clase 4: los anticuerpos de clase 4 se dirigen a epítopos altamente conservados del RBD, pero no bloquean directamente la unión a ACE2. En general, únicamente pueden unirse a la conformación “up”.

Sin embargo y como se ha mencionado anteriormente, como resultado de la adaptación de las nuevas variantes aparecen mutaciones que favorecen el escape del sistema inmunitario. Esto se traduce en una acumulación de cambios especialmente en el dominio de unión al receptor (RBD) y, en particular, en el motivo de unión al receptor (RBM), que es la región crítica para la interacción con el receptor ACE2 (Chen et al., 2023; Magnus et al., 2022).

Por lo tanto, los anticuerpos de clase 1 y 2 perderán sus capacidades de neutralización más rápidamente tras la aparición de nuevas variantes. Por el contrario, en el caso de los anticuerpos de clase 3 y 4 que se unen a epítopos altamente conservados se espera que su capacidad neutralizante sea más robusta y resistente a estas mutaciones.

Otras regiones, como el dominio N-terminal (NTD), también son diana de anticuerpos, aunque en general con menor potencia neutralizante que aquellos contra el RBD. En esta región, la mayoría de los anticuerpos monoclonales neutralizantes están dirigidos a una región denominada “supersitio de NTD”, que contiene siete sitios de N-glicosilación (N17, 61, 74, 122, 149, 165 y 234). Uno de los primeros anticuerpos identificados frente a él fue 4A8, que se une a unas zonas específicas denominadas bucles N3 y N5. Aunque, como ocurre en el caso de la región RBD, las distintas variantes también han ido desarrollando mutaciones en la región NTD, afectando a la capacidad neutralizante de estos anticuerpos (Chen et al., 2023).

Con toda esta información se puede afirmar que regiones altamente conservadas de la proteína *Spike*, como las N-glicosilaciones que utilizan como receptores CLRs (DC-SIGN

y L-SIGN) sufrirán menos cambios en la evolución del virus y sus variantes. Lo que se traduce en un importante enfoque de estudio para el desarrollo de nuevos anticuerpos neutralizantes.

1.6. EVIDENCIAS DE NEUTRALIZACIÓN DE SARS-COV-2 DEPENDIENTES DE DC-SIGN

Experimentos previos han demostrado la potencial función moduladora de receptores tipo lectinas (SIGLEC-1, DC-SIGN, L SIGN) sobre procesos de neutralización mediados por anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV-2 (Lempp et al., 2021). Concretamente, se ha observado una diferencia significativa de respuesta neutralizante al utilizar el anticuerpo monoclonal S309, anticuerpo de clase 3 antes mencionado, en infección directa y trans-infección con SARS-CoV-2Nluc (Figura 4). S309 es un precursor del anticuerpo comercial Sotrovimab, una versión estabilizada de S309 con una vida media más larga gracias a la modificación de su fragmento cristalizable (Cathcart et al., 2021).

Cuando se produce la infección directa sobre células 293T expresando ACE2, SIGLEC1 o DC-SIGN, se observa un aumento considerable de neutralización por S309 en aquellas células que contienen receptores tipo lectina, pero no en las que presentan el receptor ACE2. Esta observación, junto con su rol en experimentos de trans-infección, sugiere un papel secundario de estos receptores en la entrada de SARS-CoV-2, actuando como receptores de unión y facilitando la infección a través de la vía principal de ACE2 (Lempp et al., 2021).

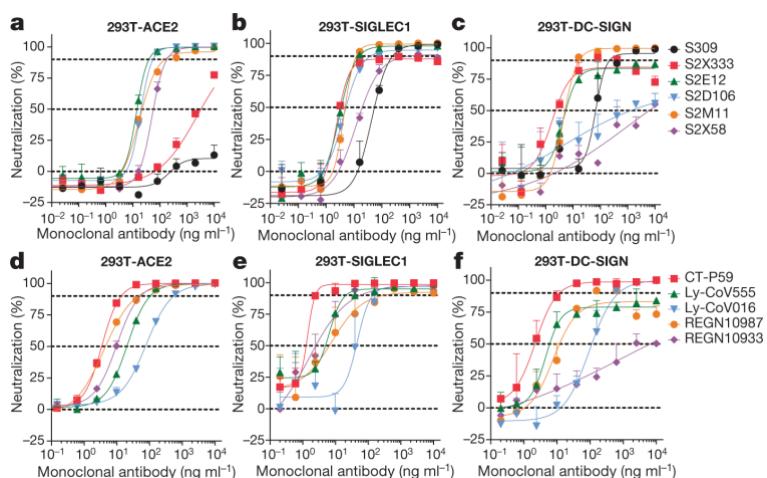


Figura 4. Tomado de Lempp et al. (2021) Nature. SIGLEC-1, DC-SIGN y L-SIGN modulan la neutralización por diferentes clases de anticuerpos.

Se ha demostrado que el receptor DC-SIGN participa en la entrada de SARS-CoV-2 en las células, y existen anticuerpos como el S309 capaces de bloquear esta interacción. Sin embargo, aún se desconoce si estos anticuerpos están presentes en los sueros de

individuos infectados o vacunados, ni cuál es su impacto funcional en la protección frente a la infección por SARS-CoV-2. Dado que DC-SIGN se une a N-glicosilaciones conservadas de la proteína *Spike*, es posible que anticuerpos de clase 3 o del supersitio de NTD, dirigidos a regiones N-glicosiladas conservadas, puedan interferir con esta vía de entrada alternativa.

2. OBJETIVOS

2.1.HIPÓTESIS

Basándonos en la función moduladora del receptor alternativo DC-SIGN durante la infección por SARS-CoV-2 y la existencia de anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción entre receptores tipo lectina y la proteína *Spike*, se plantea como hipótesis de trabajo de la existencia de anticuerpos neutralizantes en sueros de pacientes vacunados y/o infectados que bloquean la interacción entre SARS-CoV-2 y DC-SIGN. Además, estos anticuerpos pueden estar distribuidos de manera desigual entre grupos poblacionales con distinto estatus vacunal y de infección y podrían tener una contribución relevante en la protección frente a la infección por SARS-CoV-2 y sus variantes. Por tanto, un estudio más detallado de estos de la presencia y función de estos anticuerpos podría tener gran relevancia.

2.2.OBJETIVO GENERAL

Partiendo de la hipótesis planteada en este Trabajo de Fin de Máster, se establece como **objetivo general** la búsqueda de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 cuya actividad neutralizante dependa del bloqueo de la interacción entre la proteína S y el receptor alternativo DC-SIGN en sueros de personas vacunadas y/o infectadas.

2.3.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimización de un sistema experimental para detección de anticuerpos neutralizantes dependientes de DC-SIGN.
2. Análisis de la capacidad neutralizante de sueros de pacientes vacunados y/o infectados por SARS-CoV-2 a lo largo del tiempo y comparación entre grupos con distintos estatus de infección previo.
3. Evaluación de la contribución relativa a la neutralización de anticuerpos que interfieren en la interacción entre *Spike* y los receptores ACE-2 o DC-SIGN.

Desarrollo de un sistema experimental basado en la mutación de la *Spike* E484D que permita estudiar de forma específica la entrada viral independiente de ACE2, pero dependiente de TMEM106B.

3. METODOLOGÍA

3.1. LÍNEAS CELULARES

Para los experimentos realizados se han utilizado distintos tipos de células entre las que se incluyen células adherentes expresando diferentes receptores (293T, 293T-ACE2, 293T-DC-SIGN, BHK-21, A549 y Calu-3) y células no adherentes (Jurkat, Jurkat-DC-SIGN y Jurkat-L-SIGN).

Las células adherentes se cultivaron en placas Petri con DMEM 10% (Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con 10% de FBS, 0,5% de L-glutamina y 0,5% de gentamicina). Los pases se realizaron al alcanzar una confluencia del 70–90%. Para el subcultivo se empleó PBS para lavar las células y eliminar restos de suero, y tripsina, con el fin de desprender las células de la superficie de la placa de cultivo. Una vez desprendidas las células, se añadió medio DMEM 10% fresco para bloquear la acción de la enzima.

Las células no adherentes se cultivaron en frascos de cultivo (*flasks*) con RPMI 10% (Roswell Park Memorial Institute Medium suplementado con 10% de FBS, 0,5% de L-glutamina y 0,5% de gentamicina). Los pases se realizaron cada 48 horas, siguiendo el protocolo establecido. En este caso, al tratarse de células en suspensión, no fue necesario el uso de tripsina; se procedió únicamente al reemplazo parcial del medio para mantener una densidad celular adecuada.

3.2. DISEÑO DE LA TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre de 17 trabajadores sanitarios triplemente vacunados del Hospital Universitario 12 de Octubre y posteriormente infectados por la subvariante BA.1 del SARS-CoV-2 Omicron. Todas las infecciones se produjeron entre diciembre de 2021 y principios de marzo de 2022, periodo durante el cual la variante predominante en España era precisamente Omicron BA.1. Todos los participantes recibieron dos dosis de la vacuna Pfizer-BNT162b2 entre enero y febrero de 2021, con un intervalo de 21 días, y una dosis de refuerzo con la vacuna Moderna mRNA-1273 en diciembre de 2021 (Rivas et al., 2023).

Estas muestras forman parte de la cohorte *Solidarity II*, un estudio de seguimiento prolongado, aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con referencia CEI 20/157. Los sueros obtenidos a partir de las muestras de sangre fueron inactivados a 56°C durante 30 min y se han mantenido congelados a -80°C hasta su uso.

3.3. PRODUCCIÓN DE PSEUDOTIPOS DE SARS-COV-2 MEDIANTE TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA

Para un trabajo más seguro y reproducible, se trabajará con pseudotipos virales que expresen la proteína *Spike* y un gen reportero de Luciferasa (*luc*), que permitirá medir niveles de infección. Con el fin de producir pseudotipos de SARS-CoV-2 614G (número de acceso GenBank NC_045512.2 con la sustitución D614G, que se fijó en la secuencia del virus al inicio de la pandemia) se eligió utilizar un modelo basado en el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Para ello, se utilizaron células BHK-21 con un 90% de confluencia sobre las que se realizó un proceso de transfección con Lipofectamina. Primero, se preparó un tubo A con 1mL de medio OPTIMEN y 40 µL/placa de Lipofectamine® 3000 (lípido que encapsulará el plásmido para una más fácil entrada en la célula) y, un tubo B con 1 mL de medio OPTIMEN, 40 µL de P3.000 y 20 µg del plásmido correspondiente (pcDNA3.1-614G, cedido por el Dr. Juan García-Arriaza del Centro Nacional de Biotecnología). Se mezclaron ambos tubos creando burbujas con una pipeta de 5mL y se dejó incubar la mezcla 10-15 min a temperatura ambiente. Una vez incubada la mezcla de lípido-ADN se agregó sobre las células y se dejaron incubar toda la noche a 37°C. Tras la incubación, las células transfectadas deberían expresar en su superficie la *Spike* 614G.

A continuación, se lavaron las células con PBS, se agregó la mezcla de virus VSV-ΔG-luc suplementando con la glicoproteína (G) de VSV para favorecer la infección y se incubaron 1h a 37°C. El genoma de este VSV contiene todas sus proteínas estructurales a excepción de la G (ΔG), que en este caso será sustituida por *Spike* para la formación del pseudotipo. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células (mínimo 5 veces) para eliminar posibles restos de VSV-G y se administró DMEM 5% (Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con 5% FBS, 0,5% L-glutamina y 0,5% gentamicina) para dejarlas incubar toda la noche y finalizar titulando el virus al día siguiente.

Siguiendo un protocolo similar, también se generaron pseudotipos virales basados en VIH-1, con la única diferencia de que en este caso se utilizó el plásmido pNL4-3-Luc y se procedió a realizar diluciones seriadas 1:3. La columna 12 se estableció como control negativo y no se añadió virus.

Una vez preparadas todas las diluciones, se centrifugó a 500 x g durante 5 min la placa que contenía las células y se retiró el medio. Se adicionaron 200 µL de las diluciones realizadas en la placa con fondo en U y se dejó incubar durante toda la noche a 37°C.

Finalmente, se reveló la placa mediante un ensayo de luminiscencia utilizando el protocolo con luciferasa de Steady-Glo® (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se calculó el título viral. Brevemente, se centrifugaron las células a 500 x g durante 5 min, se retiró el medio y se añadieron 50 µL por pocillo del buffer de lisis Glo Lysis Buffer. Se incubaron las células durante 10 min y, a continuación, se agregaron 50 µL del sustrato para la luciferasa. De nuevo, se incubaron durante 10 minutos y se revelaron las placas utilizando el luminómetro GloMax® Navigator System (Promega) en el programa preestablecido Glo Max Navigator y con una integración de 0,3 segundos. En adelante, se calcula un título de infección de 500.000 RLU (*relative luminiscence units*) en células 293T-ACE2 para llevar a cabo todos los ensayos.

En el caso de los pseudotipos lentivirales basados, se aplicó el mismo protocolo descrito, con la única diferencia de que el tiempo de incubación de las células con el pseudotipo se extendió a 48 horas, dado que este sistema requiere un mayor tiempo para permitir una infección eficiente y la expresión del gen reportero.

3.4. NEUTRALIZACIÓN POR SOTROVIMAB, INFECCIÓN DIRECTA CON PSEUDOTIPOS BASADOS EN VSV

Para analizar la neutralización producida por el anticuerpo comercial Sotrovimab (ProteoGenix) se realizó un protocolo de neutralización utilizando como control un estándar de neutralización (NT-STD, *pool* de sueros de pacientes infectados) con NT50 (dilución de suero que neutraliza el 50% de la infección) y NT90 (dilución de suero que neutraliza el 90% de la infección) conocidas.

Se preparó una placa blanca de 96 pocillos con 293T, 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN (40.000 células/pocillo) sobre la que se realizó una infección directa con un pseudotipo basado en VSV (614G-VSV-Luc).

Como control de la neutralización se utilizó un estándar de neutralización (NT-STD) previamente caracterizado con una NT-50 conocida y se realizaron diluciones seriadas partiendo de una dilución 1:500. En el caso del Sotrovimab, se partió de una dilución inicial de 3 µg/mL y se realizaron diluciones 1:3. Se mezcló con el pseudotipo 614G-VSV-Luc y se dejó incubar durante 1h a 37°C.

Tras 50 minutos de incubación se centrifugaron las células previamente preparadas (5 min a 500 x g), se les retiró el medio y se les agregaron 200 µL de las mezclas de virus-anticuerpo. Se dejó incubar la placa durante 24h a 37°C y 5% CO₂ y se procedió al revelado, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

3.5.ENSAYO DE TRANSINFECCIÓN MEDIADO POR DC-SIGN Y L-SIGN CON PSEUDOTIPO SARS-COV-2 (614G-PNL4-3-LUC) Y NEUTRALIZACIÓN CON SOTROVIMAB

Con el propósito de evaluar la posible utilización de L-SIGN como modelo alternativo a DC-SIGN en ensayos de transinfección, se diseñó un experimento comparativo utilizando el pseudotipo 614G-pNL4-3-Luc y el anticuerpo monoclonal Sotrovimab. En este caso se utilizó el pseudotipo 614G-pNL4-3-Luc porque los pseudotipos de VSV no son capaces de infectar células Jurkat, utilizadas para ensayos de trans-infección, En primer lugar, se sembraron células 293T-ACE2 en placas blancas de 96 pocillos a una densidad de 40.000 células por pocillo. De forma paralela, se preparó una dilución del pseudotipo viral en medio RPMI 5% (suplementado con 5% FBS, 0,5% L-glutamina y 0,5% gentamicina), con el objetivo de obtener un título de infección de 500.000 RLU. Esta dilución se utilizó como base para generar distintas mezclas con y sin presencia de anticuerpo neutralizante, así como con un estándar de neutralización (NT-STD). Se incluyeron concentraciones de Sotrovimab a 1 µg/mL y 100 ng/mL, además de controles negativos sin anticuerpo y controles positivos con el estándar a diluciones equivalentes a NT90 y NT50.

Seguidamente, se contaron las células Jurkat modificadas para expresar DC-SIGN o L-SIGN, y se ajustaron para una concentración final de 150.000 células/pocillo. Las células se dividieron según la condición experimental, emparejando de forma paralela Jurkat-DC-SIGN y Jurkat-L-SIGN para cada mezcla viral preparada previamente. Además, se incluyó una condición con manano (100µg/mL para una inhibición del 100%) como inhibidor competitivo de lectinas, con el objetivo de confirmar la especificidad de la interacción mediada por estas proteínas.

Una vez finalizada la incubación entre virus y anticuerpos, las células Jurkat fueron lavadas con buffer de lavado (PBS+0,5%FBS+1mM CaCl₂) para eliminar cualquier resto libre de partículas virales, y se resuspendieron en medio fresco. A continuación, se procedió a distribuir 100 µL de cada mezcla celular en la placa con células 293T-ACE2, asegurando que cada columna representara una condición experimental concreta. Se dejó un control negativo.

Tras un periodo de incubación de 48 horas, se procedió al revelado del ensayo siguiendo el protocolo establecido de Promega ®, descrito anteriormente.

3.6.ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE SUEROS

Con el objetivo de analizar la neutralización producida por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes vacunados se realizó un protocolo de neutralización infectando 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN-GFP con el pseudotipo de SARS-CoV-2 614G-VSV-Luc previamente preparado. Los sueros que se analizaron procedían de muestras de pacientes vacunados con dos y tres dosis (2 meses post-segunda dosis, 7 meses post-segunda dosis y 2 meses post-tercera dosis). Además los sueros de individuos naïve (nunca infectados por SARS-CoV-2) 2 meses post-tercera dosis se compararon con sueros de individuos infectados tras la tercera dosis por BA.1 (infección tipo *breakthrough*) e individuos infectados antes de la primera vacunación y nuevamente tras la tercera dosis (reinfectados).

Para cada paciente se prepararon dos placas blancas de 96 pocillos de 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN-GFP con 40.000 células/pocillo, respectivamente y se dejaron incubar a 37°C hasta terminar de preparar las diluciones.

Como control de la neutralización se utilizó el anticuerpo Sotrovimab, previamente analizado. Se partió de una concentración inicial de 1 µg/mL y se realizaron diluciones 1:2 en los pocillos contiguos, obteniendo un volumen final de 110 µL. En el caso de los sueros se partió de una dilución 1:50 y se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta una dilución final de 1:25600.

Una vez completadas las diluciones se añadieron 110 µL de pseudotipo SARS-CoV-2 614G-VSV previamente preparado y diluido con DMEM 5% con el fin de conseguir un título de infección de 500.000 RLU, obteniendo así un volumen final de 220 µL por pocillo. Esta mezcla de virus y anticuerpo se dejó incubar durante 1h a 37°C.

Finalmente, se centrifugaron las células inicialmente preparadas a 500 x g durante 5 min, se les retiró el medio y se añadieron 200 µL de los pocillos correspondientes de las placas en U. Se dejaron incubar toda la noche a 37°C hasta el momento del revelado. Para el revelado se realizó el protocolo establecido de Promega®, descrito previamente.

3.7.CARACTERIZACIÓN DE LA NEUTRALIZACIÓN FRENTE A VARIANTES DE SARS-COV-2 CON SUEROS AGRUPADOS POR PERFIL INMUNITARIO

Dado el interés en analizar cómo varía la capacidad neutralizante mediada por DC-SIGN frente a variantes de SARS-CoV-2 con una progresiva distancia evolutiva respecto a las formas virales iniciales, se diseñó un experimento utilizando pseudotipos

correspondientes a las variantes 614G, Delta (B. 1.617. 2) y las variantes del linaje Omicron BA.1 y JN.1, dispuestas en orden de aparición cronológica y de divergencia antigenica creciente. Este diseño permitió analizar el comportamiento de la neutralización mediada por DC-SIGN a medida que las variantes se alejaban del virus circulante en fases tempranas de la pandemia.

Se prepararon tres pools de sueros agrupados por perfil inmunitario, como se describe anteriormente: individuos naïve, *breakthrough* y reinfectados. Cada pool se generó mezclando 25 µL de cada uno de los cuatro sueros individuales por grupo.

El ensayo se llevó a cabo en seis placas blancas de 96 pocillos, dos por cada grupo vacunal (una con 293T-ACE2 y otra con 293T-DC-SIGN). Las diluciones seriadas de cada pool se prepararon siguiendo el protocolo previamente establecido, sembrando 40.000 células por pocillo.

Cada placa se infectó con los cuatro pseudotipos mencionados, distribuidos en duplicado del siguiente modo: Filas A y B - pseudotipo 614G, C y D - pseudotipo Delta, E y F - pseudotipo BA.1, G y H - pseudotipo JN.1

Las mezclas de suero y pseudotipo se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de ser añadidas a las células. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. El revelado se realizó mediante luminiscencia utilizando el protocolo de Steady-Glo® (Promega), y las señales se midieron con el luminómetro GloMax® Navigator System.

3.8. DISEÑO Y OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN E484D EN LA PROTEÍNA

SPIKE MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Con el objetivo de disponer de un sistema que permitiera contrastar y validar los resultados obtenidos sobre la neutralización mediada por DC-SIGN, se generó una versión modificada de la proteína *Spike* que incluyera la mutación puntual E484D. Dicha mutación, descrita previamente (Arora et al., 2025; Baggen et al., 2023), ha demostrado conferir independencia de la entrada mediada por ACE2, lo que la convierte en una herramienta adecuada para estudiar de forma específica la vía de entrada alternativa dependiente de DC-SIGN.

Para ello, se llevó a cabo un proceso de mutagénesis dirigida sobre el plásmido codificador de la *Spike* 614G, empleando el kit Q5® Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs). Los oligonucleótidos *forward* (5'-TAACGGCGTGGATGG CTTCAACT-3') y *reverse* (5'-CAAGGGTGCTGCCG-3') se diseñaron específicamente para introducir la mutación E484D utilizando la herramienta online proporcionada por el propio fabricante, y se prepararon a una concentración final de 10

μM. La reacción de amplificación por PCR se realizó con la mezcla Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix y 20 ng del plásmido molde, aplicando las siguientes condiciones de termociclado: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 segundos, 25 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 61 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 6 minutos, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 2 minutos.

El producto amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. A continuación, se llevó a cabo la reacción KLD (Kinasa, Ligasa y DpnI) para fosforilar y ligar los extremos del plásmido linealizado, eliminando simultáneamente la plantilla metilada original. Tras este paso, el plásmido mutado se introdujo en células competentes *E. coli* mediante transformación, y las colonias obtenidas se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina para su posterior purificación.

La confirmación de la inserción correcta de la mutación E484D se realizó mediante secuenciación Sanger, empleando cebadores específicos flanqueando la región modificada y el kit Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, el plásmido validado se utilizó para la producción de pseudotipos basados en VSV siguiendo el protocolo descrito previamente, permitiendo evaluar la contribución de DC-SIGN a la entrada viral de forma independiente de ACE2.

3.9. VALIDACIÓN DE UN MODELO DE INFECTIVIDAD ACE2-INDEPENDIENTE MEDIADA POR DC-SIGN

Dado que la mutación E484D confiere entrada viral independiente de ACE2 pero requiere la presencia de DC-SIGN junto con la proteína transmembrana TMEM106B (Arora et al., 2025), se seleccionó el modelo celular más adecuado analizando la expresión basal de TMEM106B en distintas líneas celulares disponibles en el laboratorio. Para ello, se consultaron los datos de la página web Human Protein Atlas, observándose niveles relativamente altos de expresión (en nTPM) en las líneas Calu-3 (87,5) y A549 (78,6), que se seleccionaron para el experimento.

El diseño experimental se llevó a cabo en placas blancas de 96 pocillos e incluyó las líneas Calu-3 y A549 transfectadas de forma transitoria con un plásmido codificante para DC-SIGN-GFP (pLZRS-DC-SIGN-GFP) mediante Lipofectamine®, con el objetivo de sobre-expresar DC-SIGN, así como las mismas líneas celulares sin transfectar, utilizadas como control negativo para DC-SIGN. Además, se incorporó una fila de células transfectadas únicamente con un plásmido que codifica GFP (pNL-eGFP-CHv/wPRE) como control positivo de eficiencia de transfección. A las 24h se comprobó la expresión de GFP de las células en un microscopio de fluorescencia EVOS M5000 y, en todas las

condiciones, las células fueron infectadas con los pseudotipos generados previamente: el pseudotipo con la proteína *Spike* 614G (control) y el pseudotipo portador de la mutación E484D, ajustando la cantidad de virus añadido para obtener aproximadamente 500.000 RLUs como nivel infectivo de referencia. Por último, se incluyó una fila adicional de células no infectadas como control negativo del experimento.

Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y la cuantificación de la infección se realizó mediante un ensayo de luminiscencia siguiendo el protocolo descrito previamente, utilizando el reactivo Steady-Glo® (Promega) y el luminómetro GloMax® Navigator System.

4. RESULTADOS

4.1. VALIDACIÓN DEL MODELO DE NEUTRALIZACIÓN MEDIADA POR DC-SIGN CON SOTROVIMAB

Las evidencias de neutralización de SARS-CoV-2 dependiente de DC-SIGN son, hasta la fecha, muy escasas. Únicamente el anticuerpo comercial de clase 3, Sotrovimab, ha demostrado una acción neutralizante claramente dependiente de lectinas tipo c (Lempp et al., 2021). Por ello, primero se utilizó este anticuerpo para evaluar si el sistema experimental diseñado era útil para en el análisis de la respuesta neutralizante dependiente de DC-SIGN. Para ello el anticuerpo comercial Sotrovimab y un estándar de neutralización (NT-STD) se estudiaron, obteniéndose datos que reproducían los resultados disponibles en la literatura. En ellos se observa un aumento de la neutralización en células 293T-DC-SIGN con respecto a 293T-ACE2 cuando se suministra Sotrovimab (Figura 5), lo que indica que este anticuerpo actúa bloqueando de forma específica la entrada mediada por el receptor alternativo DC-SIGN, pero no en el NT_STD, formado por sueros de vacunados. Esto a su vez, permite establecer un control funcional que servirá como referencia para evaluar el efecto de distintos anticuerpos sobre esta vía de entrada alternativa.

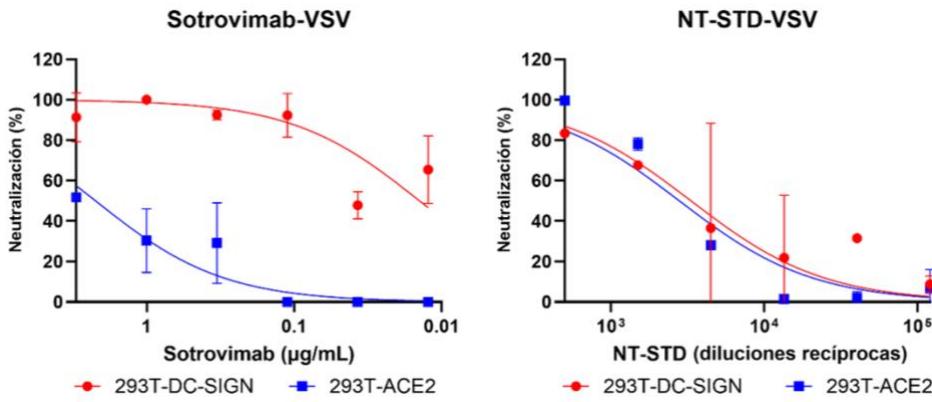


Figura 5. Comparación del efecto neutralizante de Sotrovimab en células 293T-ACE2 y 293T-DC-SIGN. La adición de Sotrovimab (panel derecho) muestra una mayor neutralización en células 293T-DC-SIGN en comparación con 293T-ACE2, lo que indica una inhibición preferente de la entrada mediada por DC-SIGN. En contraste, el estándar de neutralización (NT-STD) no muestra diferencias notables entre ambas líneas celulares (panel izquierdo).

4.2. ANÁLISIS DE LA NEUTRALIZACIÓN POST-VACUNAL EN INDIVIDUOS NAÏVE: IMPACTO SOBRE EL RECEPTOR DC-SIGN

En este segundo ensayo, el objetivo principal fue analizar si el efecto neutralizante de los anticuerpos presentes en sueros de cuatro pacientes naïve variaba cuando el receptor celular principal era ACE2 o el receptor alternativo DC-SIGN, considerando además su evolución en función del tiempo y del número de dosis recibidas. La neutralización en células 293T-ACE2 fue la esperable, con una neutralización detectable dos meses tras la segunda dosis vacunal, que disminuían a los 7 meses y que se incrementaban nuevamente dos meses tras la tercera dosis vacunal. Sin embargo, no existían diferencias significativas con respecto a la capacidad neutralizante en células 293T-DC-SIGN (Figura 6).

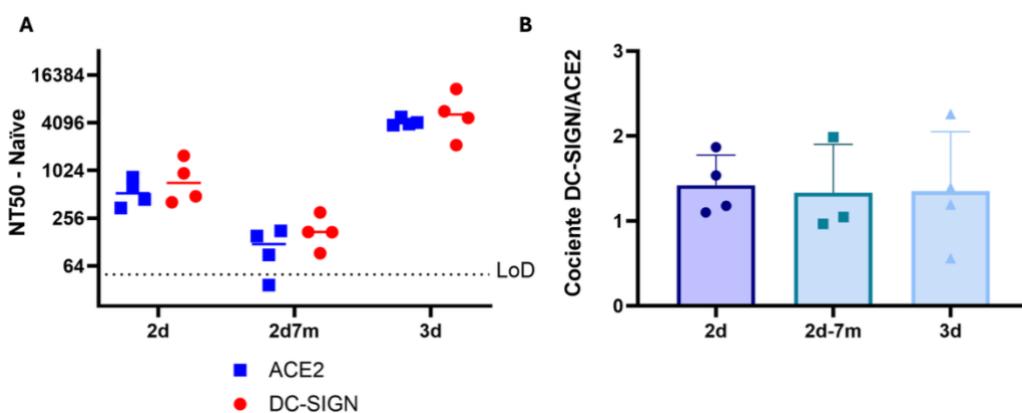


Figura 6. Evaluación de la neutralización en sueros vacunales naïve frente a ACE2 y DC-SIGN. (A) Valores de NT50 frente a 614G en células 293T-ACE2 (cuadrados azules) y 293T-DC-SIGN (círculos rojos) obtenidos a partir de sueros de individuos naïve vacunados en tres momentos: dos meses tras la segunda dosis (2d), siete meses tras la segunda dosis (2d-7m) y dos meses tras la tercera dosis (3d). La línea

discontinua indica el límite de detección (LoD = 50), correspondiente a la dilución mínima evaluada. **(B)** Representación del cociente DC-SIGN/ACE2 en cada grupo. Valores cercanos a 1 sugieren una contribución relativa similar de ambas rutas de entrada viral en los individuos naïve vacunados, independientemente del número de dosis o del tiempo post-vacunación.

4.3. CONTRIBUCIÓN DE LA NEUTRALIZACIÓN RELATIVA MEDIADA POR DC-SIGN EN GRUPOS NAÏVE, BREAKTHROUGH Y REINFECTADOS

Resultados anteriores de nuestro laboratorio, demostraron una capacidad neutralizante frente a SARS-CoV-2 en sueros de personas vacunadas tras la primera infección (*breakthrough*) que tras la segunda (reinfección) (Rivas et al., 2023). En esta sección evaluamos si esas diferencias podían deberse a diferentes contribuciones de los anticuerpos al bloqueo de la entrada mediada por DC-SIGN. Para ello comparamos la neutralización en sueros procedentes de individuos naïve vacunados con tres dosis, pacientes con infección *breakthrough* tras la vacunación y pacientes reinfectados, generando los valores de los cocientes DC-SIGN/ACE2 de los tres grupos (Figura 7). Se observó un aumento de este valor en el grupo *breakthrough*, alcanzando un valor cercano a 4, mientras que en los grupos naïve y reinfectados se mantuvo alrededor de 1. Esto sugiere que, en los pacientes con infección *breakthrough*, podría existir una mayor contribución relativa de anticuerpos capaces de bloquear la vía de entrada alternativa mediada por DC-SIGN.

No obstante, el análisis estadístico mediante test de Kruskal–Wallis no mostró diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$), se observa un claro incremento en el grupo *breakthrough* que requeriría confirmación con un mayor tamaño muestral.

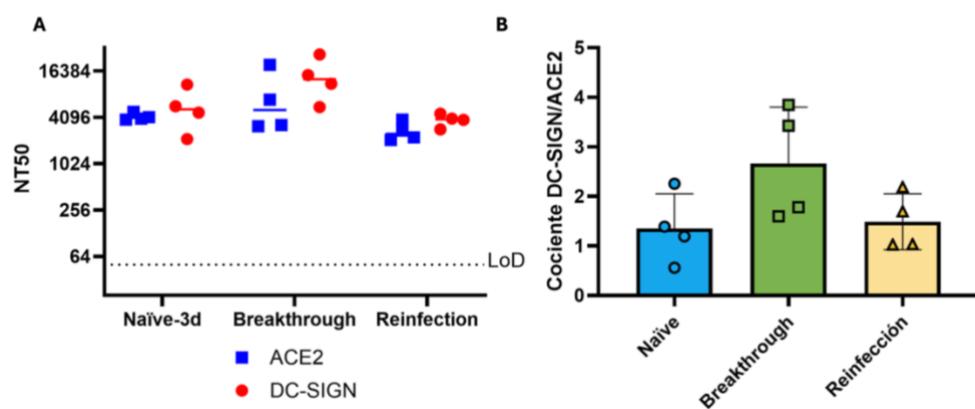


Figura 7. Neutralización y contribución relativa de anticuerpos frente a las rutas de entrada mediadas por ACE2 y DC-SIGN según perfil inmunitario. **(A)** Valores de NT50 en sueros de individuos naïve vacunados con tres dosis, pacientes con infección *breakthrough* y pacientes reinfectedados.

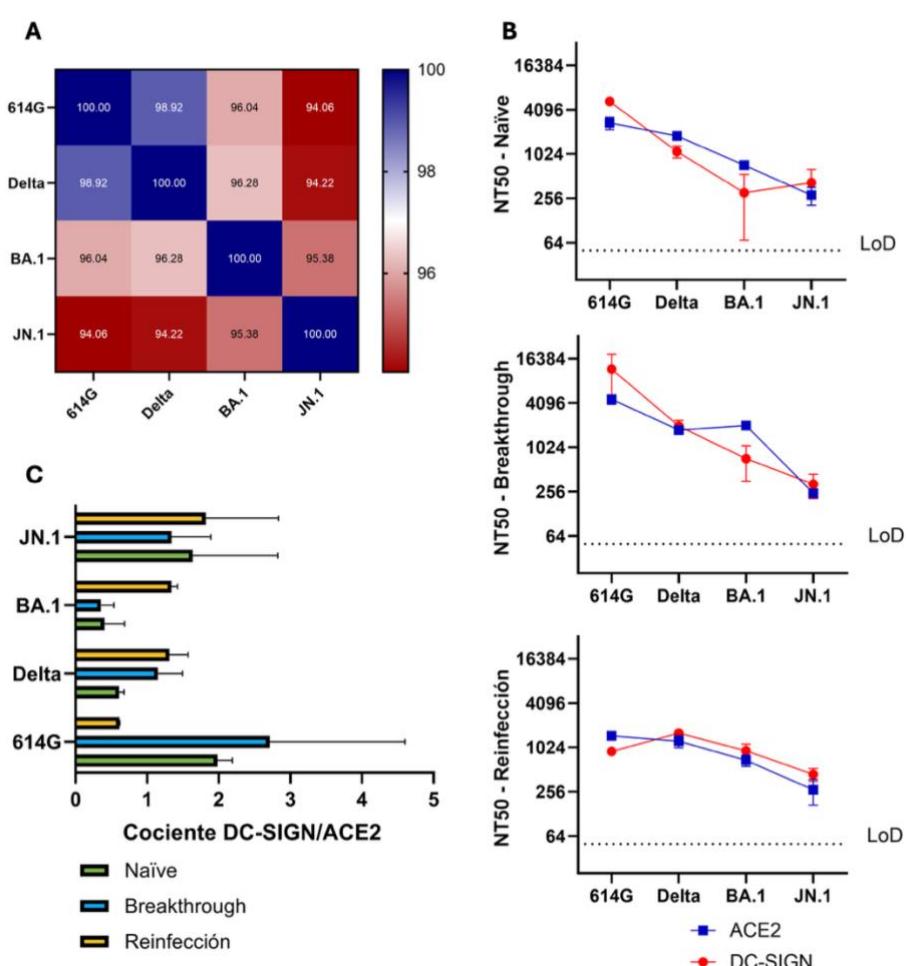
(B) Cociente DC-SIGN/ACE2 en los tres grupos. Se observa un aumento del cociente en el grupo *breakthrough*, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Kruskal–Wallis, $p > 0,05$).

4.4. PATRÓN DE NEUTRALIZACIÓN FRENTE A VARIANTES DE SARS-COV-2 SEGÚN PERFIL INMUNITARIO

Si los anticuerpos neutralizantes que dependen de DC-SIGN tienen una contribución relevante a la protección frente al virus, es esperable que el virus evolucione hacia una respuesta de escape, como se ha observado con en ensayos de neutralización clásicos para variantes altamente mutadas, como el linaje Ómicron (Cheng et al., 2022). Los resultados obtenidos tras analizar el efecto de las distintas variantes de SARS-CoV-2 mostraron una disminución progresiva de la neutralización a medida que las variantes se alejaban filogenéticamente de la 614G, siguiendo una tendencia paralela para ACE2 y DC-SIGN (Figura 8A y B).

En el grupo de pacientes reinfectedados se observó un aumento en la neutralización frente a la variante BA.1, posiblemente relacionado con la coincidencia temporal entre la reinfección y la circulación de esta subvariante. Por otra parte, el análisis de los cocientes DC-SIGN/ACE2 (Figura 8C) reveló que los grupos naïve y *breakthrough* mantuvieron

una



tendencia similar entre variantes, mientras que el grupo reinfectados presentó un perfil diferente, cuya causa no pudo establecerse por la falta de experimentos adicionales

Figura 8. Patrón de neutralización frente a variantes de SARS-CoV-2 y contribución relativa de la vía DC-SIGN según perfil inmunitario. **(A)** Mapa de calor que muestra el porcentaje de identidad a nivel de secuencia de la proteína *Spike* entre las variantes de SARS-CoV-2: 614G, Delta, BA.1 y JN.1. **(B)** Se muestran los valores de NT50 frente a las distintas variantes, obtenidos a partir de pools de sueros de individuos naïve vacunados con tres dosis, pacientes con infección *breakthrough* y pacientes reinfectados. Los puntos correspondientes a ACE2 aparecen en color rojo con cuadrados, mientras que los correspondientes a DC-SIGN se representan en rojo con círculos. **(C)** Valores de los cocientes de NT50 DC-SIGN/ACE2 frente a las variantes mencionadas en los grupos naïve vacunados con tres dosis, pacientes con infección *breakthrough* y pacientes reinfectados.

4.5. VALIDACIÓN DE LA MUTACIÓN E484D Y ANÁLISIS FUNCIONAL EN MODELOS CELULARES TRANSFECTADOS CON DC-SIGN

Para confirmar la correcta inserción de la mutación E484D en el plásmido codificador de la proteína *Spike*, se secuenciaron cuatro clones obtenidos tras la transformación bacteriana. En dos de ellos se comprobó la presencia correcta de la mutación en la región esperada (Figura 9A), obteniendo los plásmidos adecuados para su posterior uso experimental.

Para garantizar la eficacia de la transfección transitoria de DC-SIGN en las líneas celulares seleccionadas (Calu-3 y A549), se verificó la expresión de GFP a las 24 h mediante microscopía de fluorescencia. Se observó una fluorescencia intensa y homogénea en las células transfectadas únicamente con el plásmido GFP (control positivo), mientras que en las células transfectadas con el plásmido DC-SIGN-GFP se detectó un número menor de células GFP positivas, aunque claramente visibles. En contraste, las células no transfectadas no presentaron señal de fluorescencia, confirmando así la eficiencia de la transfección (Figura 9B).

Finalmente, en el ensayo de infección con pseudotipos, se detectaron niveles de infección tanto con el pseudotipo *Spike* 614G como con el portador de la mutación E484D en la mayoría de las condiciones analizadas. En ambos casos, la sobreexpresión transitoria de DC-SIGN incrementó la señal de infección respecto a las células no transfectadas, especialmente en las líneas 293T y A549, mientras que en Calu-3 la infectividad resultó muy baja en todos los casos. Estos resultados apoyan que DC-SIGN contribuye a potenciar la entrada viral, independientemente de la mutación E484D, pero sería

necesario bloquear ACE2 para observar diferencias entre la secuencia original y la mutada (Figura 9C).

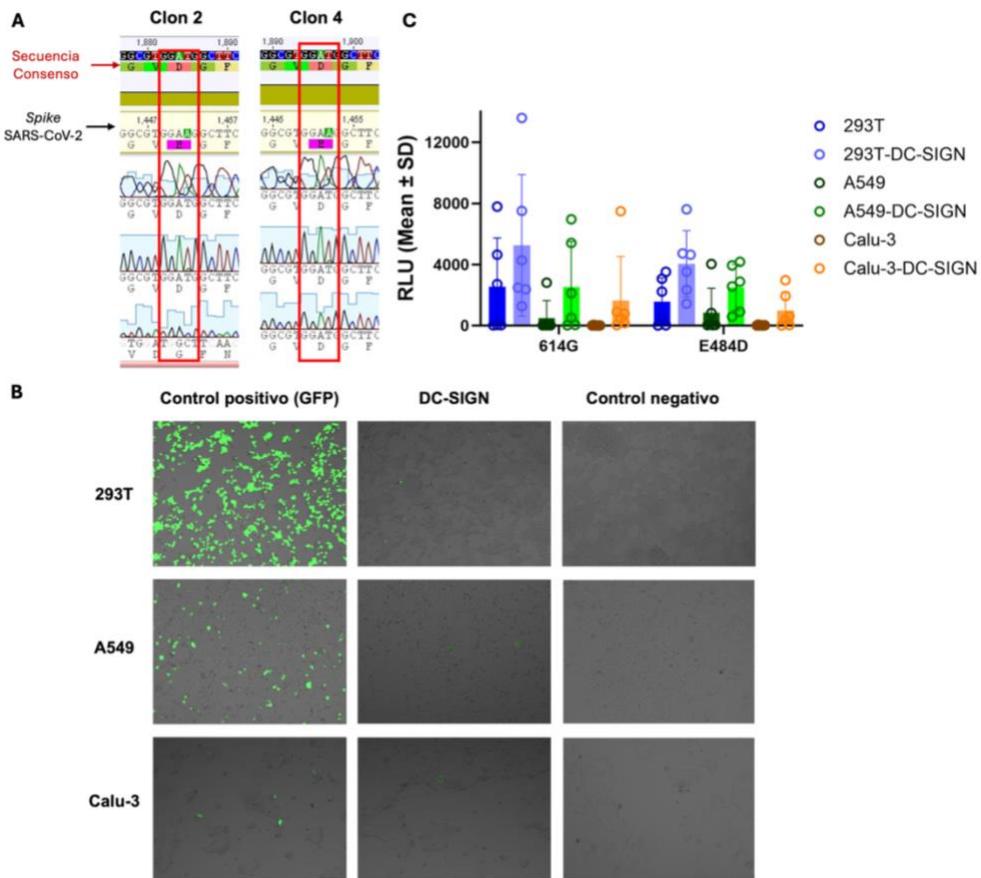


Figura 9. Validación de la mutación E484D y análisis funcional en modelos celulares transfectados con DC-SIGN. **(A)** Confirmación por secuenciación Sanger de la inserción correcta de la mutación E484D en dos de los clones seleccionados (clones 2 y 4), evidenciando el cambio esperado en la región correspondiente del gen de la proteína *Spike*. **(B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia a las 24 h tras la transfección transitoria: control positivo (plásmido GFP), transfección con plásmido DC-SIGN-GFP y control negativo (sin transfección) en las líneas celulares 293T, A549 y Calu-3, que demuestran la eficacia de la transfección y la expresión de GFP. **(C)** Resultados del ensayo de infectividad mediante luminiscencia (RLU, media ± SD) tras la infección con pseudotipos Spike 614G y E484D en las distintas condiciones experimentales

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado el efecto neutralizante de anticuerpos presentes en sueros de diferentes grupos de individuos vacunados y/o infectados por SARS-CoV-2, con especial atención a la vía de entrada alternativa mediada por el receptor DC-SIGN.

Los resultados obtenidos permiten reflexionar sobre varios aspectos relevantes relacionados con la respuesta humoral, la especificidad de los anticuerpos y la influencia del perfil inmunitario previo.

En primer lugar, la validación del modelo de neutralización mediada por DC-SIGN mediante el uso de Sotrovimab permitió confirmar observaciones previas descritas por (Lempp et al., 2021), evidenciando un efecto neutralizante más pronunciado frente a DC-SIGN que frente a ACE2. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que Sotrovimab puede bloquear la entrada de SARS-CoV-2 a través del receptor alternativo DC-SING y la utilidad del modelo como control funcional para estudiar el bloqueo de esta vía de entrada alternativa.

Tras analizar los sueros de individuos naïve vacunados, no se observaron diferencias significativas entre la neutralización mediada por ACE2 y por DC-SIGN, independientemente del número de dosis administradas o del tiempo transcurrido desde la vacunación. Este resultado sugiere que, en ausencia de infección natural, la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna se dirige principalmente hacia epítopos implicados en la vía principal de entrada mediada por ACE2, probablemente en su mayoría anticuerpos de clase 1 y 2 dirigidos frente al RBM, en línea con estudios previos que describen una neutralización centrada fundamentalmente en esta ruta (Cameroni et al., 2022; Schmidt et al., 2021).

Por otra parte, en el grupo de pacientes con infección *breakthrough* se observó un incremento del cociente DC-SIGN/ACE2, lo que sugiere que la exposición al virus tras la vacunación podría inducir anticuerpos con mayor capacidad para bloquear la vía de entrada alternativa. Aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística, apunta a que la infección tras la vacunación podría diversificar la respuesta neutralizante más allá de la ruta principal mediada por ACE2. Sería interesante confirmar esta tendencia en estudios con mayor tamaño muestral. La presencia de estos anticuerpos podría explicar la mayor capacidad neutralizante observada en individuos con infección *breakthrough* frente a los reinfectados, como se ha descrito previamente (Rivas et al., 2023).

Con respecto a los análisis utilizando cuatro variantes diferentes (614G, Delta, BA.1 y JN.1), se constató una disminución progresiva de la neutralización conforme aumentaba la distancia antigenica respecto a 614G, de forma paralela para ambas vías de entrada (ACE-2 y DC-SIGN). Este patrón concuerda con trabajos previos que muestran una menor eficacia de los anticuerpos neutralizantes frente a variantes con mutaciones relevantes en el RBD (Liu et al., 2022). De manera excepcional, en el grupo de pacientes

reinfectados se detectó un aumento en la neutralización frente a la variante BA.1, que probablemente podría explicarse porque la reinfección coincidió temporalmente con la circulación de esta subvariante. Además, el perfil diferente que mostró el cociente DC-SIGN/ACE 2 en este grupo no pudo ser explicado con los datos disponibles, lo que pone de manifiesto la complejidad de la respuesta humoral en contextos de reinfección y la necesidad de estudios adicionales.

En relación con los experimentos de mutagénesis y validación del modelo ACE2-independiente, se confirmó mediante secuenciación que la mutación E484D se insertó correctamente en dos de los clones seleccionados, garantizando la obtención de constructos funcionales para los ensayos posteriores. La sobreexpresión transitoria de DC-SIGN incrementó los niveles de infección detectados por luminiscencia en las líneas celulares 293T y A549, mientras que en Calu-3 la infectividad permaneció baja en todas las condiciones. Estos resultados sugieren que DC-SIGN contribuye a favorecer la entrada viral independientemente de la presencia de la mutación E484D, pero no afecta a la participación de ACE2. Por ello, resulta necesario diseñar experimentos adicionales que bloquen específicamente la entrada mediada por ACE2, como el uso de anticuerpos que bloquen este receptor (Arora et al., 2025). Esta estrategia permitiría comprobar si la mutación posibilita una ruta alternativa mediada exclusivamente por DC-SIGN y TMEM106B, y verificar si la neutralización observada en los ensayos depende efectivamente de esta vía de entrada.

En conjunto, estos resultados contribuyen a comprender mejor cómo la historia inmunitaria puede influir en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar el virus, no solo frente al receptor principal ACE2, sino también afectando a vías de entrada alternativas como DC-SIGN. Sin embargo, el número limitado de muestras y la ausencia de confirmación funcional de algunos hallazgos constituyen limitaciones que deberán abordarse en trabajos futuros.

5.1.OBJETIVOS DE SOSTENIBILIDAD

Este trabajo se integra en el marco del Objetivo de Desarrollo Sostenible 3 (“Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades”), en particular en las metas 3.b y 3.d, orientadas a promover la investigación de vacunas y terapias frente a enfermedades transmisibles y a reforzar la preparación ante futuras epidemias. El estudio de rutas de entrada alternativas como DC-SIGN contribuye a identificar nuevas dianas terapéuticas y estrategias de inmunización, ampliando la

respuesta frente a variantes que puedan escapar parcialmente a la neutralización mediada por ACE2.

Este tipo de investigaciones fortalecen los sistemas sanitarios al generar conocimiento que puede transformarse en medidas preventivas más eficaces, universales y accesibles, reduciendo desigualdades y beneficiando especialmente a poblaciones vulnerables.

Como propuesta de futuro, se plantea integrar estos hallazgos en programas de vigilancia y desarrollo de nuevas vacunas, contribuyendo así a los objetivos de salud global definidos en la Agenda 2030.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha validado un modelo experimental eficaz para el estudio de la neutralización de SARS-CoV-2 mediada DC-SIGN, confirmando que esta vía alternativa puede ser bloqueada por anticuerpos como Sotrovimab.
2. En individuos naïve vacunados, la neutralización se dirigió principalmente contra la vía ACE2, sin diferencias significativas frente a DC-SIGN, lo que indica una respuesta humoral centrada en bloquear la entrada por el receptor principal.
3. En individuos con infección *breakthrough* se observó un mayor bloqueo de la vía DC-SIGN, lo que podría reflejar una diversificación del repertorio de anticuerpos inducida por la infección tras la vacunación, aunque sin alcanzar significación estadística.
4. Frente a variantes más alejadas del virus original, se detectó una disminución progresiva de la neutralización tanto en ACE2 como en DC-SIGN, confirmando que la evasión de la respuesta inmunitaria afecta de manera similar a ambas rutas de entrada.
5. En el grupo de individuos reinfectedados, se detectó una mayor capacidad neutralizante frente a la variante BA.1, responsable de la reinfección, y un perfil diferencial en la contribución relativa de DC-SIGN, cuya interpretación requeriría estudios adicionales.
6. La generación de pseudotipos con la mutación E484D ha permitido avanzar en un modelo de entrada independiente de ACE2 para el estudio de DC-SIGN, aunque requiriendo todavía optimización experimental.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abulsoud, A. I., El-Husseiny, H. M., El-Husseiny, A. A., El-Mahdy, H. A., Ismail, A., Elkhawaga, S. Y., Khidr, E. G., Fathi, D., Mady, E. A., Najda, A., Algahtani, M., Theyab, A., Alsharif, K. F., Albrakati, A., Bayram, R., Abdel-Daim, M. M., & Doghish, A. S. (2023). Mutations in SARS-CoV-2: Insights on structure, variants, vaccines, and biomedical interventions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 113977. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113977>
2. Arora, P., Zhang, L., Nehlmeier, I., Kempf, A., Graichen, L., Kreitz, E., Sidarovich, A., Rocha, C., Gärtner, S., Winkler, M., Schulz, S., Jäck, H.-M., Hoffmann, M., & Pöhlmann, S. (2025). Host cell lectins ASGR1 and DC-SIGN jointly with TMEM106B confer ACE2 independence and imdevimab resistance to SARS-CoV-2 pseudovirus with spike mutation E484D. *Journal of Virology*, 99(2), e01230-24. <https://doi.org/10.1128/jvi.01230-24>
3. Baggen, J., Jacquemyn, M., Persoons, L., Vanstreels, E., Pye, V. E., Wrobel, A. G., Calvaresi, V., Martin, S. R., Roustan, C., Cronin, N. B., Reading, E., Thibaut, H. J., Vercruyse, T., Maes, P., De Smet, F., Yee, A., Nivitchanyong, T., Roell, M., Franco-Hernandez, N., ... Daelemans, D. (2023). TMEM106B is a receptor mediating ACE2-independent SARS-CoV-2 cell entry. *Cell*, 186(16), 3427-3442.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.06.005>
4. Cameroni, E., Bowen, J. E., Rosen, L. E., Saliba, C., Zepeda, S. K., Culap, K., Pinto, D., VanBlargan, L. A., De Marco, A., Di Julio, J., Zatta, F., Kaiser, H., Noack, J., Farhat, N., Czudnochowski, N., Havenar-Daughton, C., Sprouse, K. R., Dillen, J. R., Powell, A. E., ... Corti, D. (2022). Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*, 602(7898), 664-670. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04386-2>
5. Cathcart, A. L., Havenar-Daughton, C., Lempp, F. A., Ma, D., Schmid, M. A., Agostini, M. L., Guarino, B., Di Julio, J., Rosen, L. E., Tucker, H., Dillen, J., Subramanian, S., Sloan, B., Bianchi, S., Pinto, D., Saliba, C., Culap, K., Wojcechowskyj, J. A., Noack, J., ... Hebner, C. M. (2021). *The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434607>
6. Chen, Y., Zhao, X., Zhou, H., Zhu, H., Jiang, S., & Wang, P. (2023). Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Nature*

- Reviews Immunology*, 23(3), 189-199. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00784-3>
7. Cheng, S. M. S., Mok, C. K. P., Leung, Y. W. Y., Ng, S. S., Chan, K. C. K., Ko, F. W., Chen, C., Yiu, K., Lam, B. H. S., Lau, E. H. Y., Chan, K. K. P., Luk, L. L. H., Li, J. K. C., Tsang, L. C. H., Poon, L. L. M., Hui, D. S. C., & Peiris, M. (2022). Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. *Nature Medicine*, 28(3), 486-489. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01704-7>
 8. Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. En H. J. Maier, E. Bickerton, & P. Britton (Eds.), *Coronaviruses* (Vol. 1282, pp. 1-23). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
 9. Gross, L. Z. F., Sacerdoti, M., Piiper, A., Zeuzem, S., Leroux, A. E., & Biondi, R. M. (2020). ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators. *ChemMedChem*, 15(18), 1682-1690. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000368>
 10. Gupta, J., Malik, Md. Z., Chaturvedi, M., Mishra, M., Mishra, S. K., Grover, A., Ray, A. K., & Chaturvedi, R. (2023). SARS CoV-2 spike protein variants exploit DC-SIGN/DC-SIGNR receptor for evolution and severity: An in-silico insight. *VirusDisease*, 34(2), 278-296. <https://doi.org/10.1007/s13337-023-00820-3>
 11. Hoffmann, D., Mereiter, S., Jin Oh, Y., Monteil, V., Elder, E., Zhu, R., Canena, D., Hain, L., Laurent, E., Grünwald-Gruber, C., Klausberger, M., Jonsson, G., Kellner, M. J., Novatchkova, M., Ticevic, M., Chablot, A., Wirnsberger, G., Hagelkruys, A., Altmann, F., ... Penninger, J. M. (2021). Identification of lectin receptors for conserved SARS-CoV-2 glycosylation sites. *The EMBO Journal*, 40(19), e108375. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108375>
 12. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
 13. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>

14. Lempp, F. A., Soriaga, L. B., Montiel-Ruiz, M., Benigni, F., Noack, J., Park, Y.-J., Bianchi, S., Walls, A. C., Bowen, J. E., Zhou, J., Kaiser, H., Joshi, A., Agostini, M., Meury, M., Dellota, E., Jaconi, S., Cameroni, E., Martinez-Picado, J., Vergara-Alert, J., ... Corti, D. (2021). Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature*, 598(7880), 342-347. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03925-1>
15. Lim, S., Zhang, M., & Chang, T. L. (2022). ACE2-Independent Alternative Receptors for SARS-CoV-2. *Viruses*, 14(11), 2535. <https://doi.org/10.3390/v14112535>
16. Liu, L., Iketani, S., Guo, Y., Chan, J. F.-W., Wang, M., Liu, L., Luo, Y., Chu, H., Huang, Y., Nair, M. S., Yu, J., Chik, K. K.-H., Yuen, T. T.-T., Yoon, C., To, K. K.-W., Chen, H., Yin, M. T., Sobieszczynk, M. E., Huang, Y., ... Ho, D. D. (2022). Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 602(7898), 676-681. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04388-0>
17. Magnus, C. L., Hiergeist, A., Schuster, P., Rohrhofer, A., Medenbach, J., Gessner, A., Peterhoff, D., & Schmidt, B. (2022). Targeted escape of SARS-CoV-2 in vitro from monoclonal antibody S309, the precursor of sotrovimab. *Frontiers in Immunology*, 13, 966236. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.966236>
18. Pinto, D., Park, Y.-J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., Peter, A., Guarino, B., Spreafico, R., Cameroni, E., Case, J. B., Chen, R. E., Havenar-Daughton, C., Snell, G., Telenti, A., ... Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, 583(7815), 290-295. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>
19. Rivas, G., Labiod, N., Luczkowiak, J., Lasala, F., Rolo, M., Mancheño-Losa, M., Rial-Crestelo, D., Lora-Tamayo, J., Pérez-Rivilla, A., Folgueira, M. D., & Delgado, R. (2023). Superior neutralizing response after first versus second SARS-CoV-2 infection in fully vaccinated individuals. *Journal of Medical Virology*, 95(11), e29225. <https://doi.org/10.1002/jmv.29225>
20. Schmidt, F., Weisblum, Y., Rutkowska, M., Poston, D., DaSilva, J., Zhang, F., Bednarski, E., Cho, A., Schaefer-Babajew, D. J., Gaebler, C., Caskey, M., Nussenzweig, M. C., Hatzioannou, T., & Bieniasz, P. D. (2021). High genetic barrier to SARS-CoV-2 polyclonal neutralizing antibody escape. *Nature*, 600(7889), 512-516. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04005-0>

21. Thépaut, M., Luczkowiak, J., Vivès, C., Labiod, N., Bally, I., Lasala, F., Grimoire, Y., Fenel, D., Sattin, S., Thielen, N., Schoehn, G., Bernardi, A., Delgado, R., & Fieschi, F. (2021). DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLOS Pathogens*, 17(5), e1009576. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009576>
22. Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
23. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501), 330-333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
24. Yadav, T., Kumar, S., Mishra, G., & Saxena, S. K. (2023). Tracking the COVID-19 vaccines: The global landscape. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 19(1), 2191577. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2191577>
25. Zhang, Y., Zhao, W., Mao, Y., Chen, Y., Wang, S., Zhong, Y., Su, T., Gong, M., Du, D., Lu, X., Cheng, J., & Yang, H. (2021). Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20, 100058. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002295>