



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUÍS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

Producción y caracterización de antígenos del SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos como acarreador

Tesis que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Escudero Pozos Hebert

Director de Tesis: **Dr. Sergio Rosales
Mendoza**

Codirectora de Tesis: **Dra. Alejandra
Wong Arce**



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP - Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Tesis digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Producción y caracterización de antígenos del SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos como acarreador © 2026 por Escudero Pozos, Hebert se distribuye bajo una licencia de Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biofármacos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas, en el periodo comprendido entre agosto de 2023 y Julio de 2025, bajo la dirección de Dr. Sergio Rosales Mendoza y Dra. Alejandra Wong Arce.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 003382. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 4000905, Número de CVU: 1317074.

Los datos del trabajo titulado “PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DEL SARS-COV-2 EMPLEANDO EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA DE TÉTANOS COMO ACARREADOR” se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

REGISTRO DE TESIS DE MAESTRÍA

GENERACIÓN: 2023-2025

Nombre del Alumno __Hebert Escudero Pozos__

Tema de Tesis __Producción y caracterización de antígenos del SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos como acarreador__

Línea de Investigación en la que se inserta la Tesis __Estrategias Antimicrobianas y Farmacoterapéuticas__

COMITÉ TUTELAR

	Nombre	Firma
Director de tesis	Dr. Sergio Rosales Mendoza	
Codirector de tesis (Opcional)	Dra. Alejandra Wong Arce	
Asesor del PCFB	Dra. Diana Patricia Portales Pérez	
Asesor del PCFB	Dr. Juan Manuel Vargas Morales	

Trabajo de tesis vinculada con:

Convenio _____ Servicio _____ Proyecto __X__ Grupo _____ Artículo _____

26 de agosto de 2020

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA.
PROFESOR INVESTIGADOR.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.
PRESENTE.

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo titulado "DESARROLLO Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE VACUNAS INNOVADORAS CONTRA SARS-COV-2", se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 26 de agosto del año en curso por el Comité Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

APROBADO

Su protocolo tiene la clave **CEID2020-07R1**.

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el Art. 13, en particular al apartado 13.2.2:

El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un informe anual que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe.

ATENTAMENTE

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
Presidente del CEID-FCQ





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUÍS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

Producción y caracterización de antígenos del SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos como acarreador

Tesis que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Escudero Pozos Hebert

SINODALES:

Presidente: Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Secretario: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Vocal: Dra. Alejandra Wong Arce

Vocal: Dr. Juan Manuel Vargas Morales

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P

Febrero 2026

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dr. Sergio Rosales Mendoza: Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Alejandra Wong Arce: Codirector de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Diana Patricia Portales Pérez: Tutora de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Juan Manuel Vargas Morales: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Maestría

Formato M5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a 02/ 14 /2026

En la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P. el día 14 del mes de febrero del año 2026 El que suscribe Hebert Escudero Pozos Alumno del programa de posgrado en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la Facultad de Ciencias químicas manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Rosales Mendoza y codirección de la Dra. Alejandra Wong Arce y cede los derechos del trabajo titulado "PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DEL SARS-COV-2 EMPLEANDO EL FRAGMENTO C DE LA TOXINA DE TÉTANOS COMO ACARREADOR" a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección hebert.escudero@hotmail.com; rosales.s@uaslp.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Hebert Escudero Pozos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Maestría

Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 02/ 13 /2026

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada "Producción y caracterización de antígenos del SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos como acarreador" presentada por el autor Hebert Escudero Pozos. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 2% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. CLAUDIA ESCUDERO LOURDES
Coordinadora Académica del Posgrado en Ciencias
Farmacobiológicas

Dedicatorias y agradecimientos especiales

Con todo mi amor, dedico este trabajo a quienes siempre han sido mi pilar. A mis padres, Hebert y Male, quienes con su ejemplo y amor incondicional me han forjado y que, sin lugar a dudas, seguirán siendo parte de mi vida siempre. A Joamit, mi hermana y amiga fiel, que ha estado a mi lado en todo momento, brindándome su apoyo. A Paula, mi alegría pura, que con su luz siempre ilumina mi camino. Y a Vale, mi compañera incansable, quien con su cariño me ha acompañado y dado fuerzas en cada paso que he dado. Gracias, desde lo más profundo de mi corazón, por estar siempre ahí.

Resumen

La pandemia causada por el SARS-CoV-2 ha representado uno de los mayores desafíos sanitarios a nivel global en las últimas décadas. Las vacunas basadas en proteínas multiepitópicas representan una estrategia para combatir a los patógenos virales debido a que su diseño racional puede permitir alcanzar una alta eficacia y seguridad a la vez que se pueden adaptar fácilmente a nuevas variantes. En este trabajo se diseñó, produjo y evaluó una proteína multiepitópica llamada TTC-mep, basada en epítomos de la proteína Spike de SARS-CoV-2, que se fusionaron al fragmento C de la toxina tetánica (TTC) como acarreador inmunogénico. Se empleó *Escherichia coli* como sistema de expresión para TTC-mep, evaluando diferentes condiciones de inducción para optimizar la expresión, se analizó la solubilidad del antígeno y se implementaron estrategias de purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). La identidad de la TTC-mep se confirmó mediante análisis electroforéticos de inmunodetección. Finalmente, la inmunogenicidad de TTC-mep fue evaluada en ratones BALB/c, lo que permitió probar la inducción de anticuerpos específicos para TTC-mep y al TTC; sin embargo, la respuesta humoral frente a la proteína Spike fue limitada, lo que sugiere que el plegamiento y la conformación estructural del antígeno debe ser optimizado en estudios posteriores. Este estudio demuestra la viabilidad de una plataforma bacteriana para la producción de proteínas multiepitópicas y establece un marco metodológico para la optimización futura del diseño antigénico, con potencial aplicación en el desarrollo de vacunas frente a SARS-CoV-2 y otros patógenos emergentes de relevancia en salud pública.

Palabras clave: SARS-CoV-2, vacuna multiepitópica, *E. coli*, acarreador.

Abstract

The pandemic caused by SARS-CoV-2 has represented one of the greatest global public health challenges in recent decades. Multiepitope protein-based vaccines represent a promising strategy to combat viral pathogens, as their rational design can achieve high efficacy and safety while allowing rapid adaptation to emerging variants. In this study, a multiepitope protein named TTC-mep was designed, produced, and evaluated. TTC-mep is based on epitopes derived from the SARS-CoV-2 Spike protein fused to the tetanus toxin C-fragment (TTC) as an immunogenic carrier. *Escherichia coli* was employed as the expression system for TTC-mep, and different induction conditions were evaluated to optimize protein expression. Antigen solubility was analyzed, and purification strategies based on immobilized metal affinity chromatography (IMAC) were implemented. The identity of TTC-mep was confirmed by immunodetection-based electrophoretic analyses. Finally, the immunogenicity of TTC-mep was evaluated in BALB/c mice, demonstrating the induction of specific antibodies against TTC-mep and TTC; however, the humoral response against the Spike protein was limited, suggesting that antigen folding and structural conformation should be optimized in future studies. This work demonstrates the feasibility of a bacterial platform for the production of multiepitope proteins and establishes a methodological framework for further optimization of antigen design, with potential application in the development of vaccines against SARS-CoV-2 and other emerging pathogens of public health relevance.

Keywords: SARS-CoV-2, multiepitope vaccine, *E. coli*, Carrier.

Contenido

1	Introducción	1
2	Antecedentes.....	5
2.1	SARS-Cov-2 y su epidemiología	5
2.2	Estructura y mecanismos de infección	7
2.3	Respuesta inmune ante el virus	9
2.4	Vacunas contra COVID-19	12
2.5	Vacunas basadas en proteínas y multiepitópicas	14
2.7	Respuesta Inmune adaptativa y mecanismos de protección inducidos por vacunas	15
2.8	Adyuvantes para vacunas.....	18
2.9	Toxoide tetánico y TTC como adyuvantes y acarreadores	19
3	Justificación.....	20
4	Hipótesis.....	21
5	Objetivos	22
5.1	General.....	22
5.2	Específicos	22
6	Material y métodos	22
6.1	Selección de epítopes y construcción del vector	22
6.2	Transformación de cepa bacteriana y expresión de la proteína	23

6.3 Extracción de proteína soluble e insoluble	24
6.4 Lavados de cuerpos de inclusión	24
6.5 Purificación y replegamiento de la proteína	25
6.6 Análisis SDS-PAGE y Western Blot	26
6.7 Evaluación inmunológica	27
6.8 Determinación de títulos de anticuerpos mediante ELISA	28
7 Resultados	29
7.2 Detección por dot blot y evidencia de expresión basal a 15°C, 1 g/L lactosa y 7 horas de inducción.	31
7.3 Cinética de expresión soluble a 6 °C	33
7.4 Precipitación de la proteína soluble destinada a la purificación por IMAC....	34
7.5 Evaluación de la fracción insoluble: cuerpos de inclusión	35
7.6 Enriquecimiento de la proteína recombinante en la fracción insoluble	37
7.7 Selección de fracciones para replegamiento y cuantificación por densitometría	39
7.8 Respuesta humoral específica por ELISA	40
7.9 Inmunización con TTC-mep de referencia	41
8 Discusión	43
9 Conclusiones	48
10 Bibliografía	49

1 Introducción

La pandemia de COVID-19 evidenció la necesidad de plataformas vacunales rápidas, seguras y escalables que puedan actualizarse frente a variantes genéticas del SARS-CoV-2 y, a la vez, desplegarse en sistemas de salud con limitaciones económicas y logísticas. En este panorama, las vacunas de subunidades proteicas y, dentro de ellas, los diseños multiepitópicos representan una alternativa atractiva que permiten concentrar la respuesta inmune en antígenos inductores de células B y T como objetivo de protección, evitando regiones prescindibles y modulando, mediante la arquitectura del antígeno y la formulación, la calidad de la respuesta inmunitaria (Fliesler, 2021). Las ventajas logísticas son igualmente importantes, estas formulaciones son más económicas, más simples de almacenar y seguras que los virus inactivados y, en muchos contextos, más compatibles con cadenas de manufactura existentes en países de renta media y baja, lo que posibilita una respuesta sanitaria más ágil y autónoma (WHO, 2024).

La experiencia adquirida durante la emergencia de salud pública de importancia internacional por COVID-19 mostró un conflicto entre velocidad de desarrollo y capacidad de implementación. Las vacunas de ARNm ofrecieron una respuesta veloz ante nuevas variantes, pero su despliegue masivo implicó cuellos de botella logísticos y de infraestructura avanzada, de igual forma la rápida mutación del SARS-CoV-2 obligó a una actualización frecuente de los antígenos (Pfizer España, 2020). En este contexto, las proteínas recombinantes aparecen como una alternativa de bajo costo, efectivas y actualizables. Su fabricación puede realizarse en sistemas microbianos estandarizados, su estabilidad es mayor que la de otras formulaciones y su diseño antigénico puede adaptarse sin rediseñar toda la plataforma (Singh et al., 2021).

Es así que en lugar de presentar al sistema inmune la proteína completa del patógeno, estas vacunas se basan en péptidos específicos (o diseños multiepitótopo) que

corresponden a las regiones inmunogénicas relevantes (por ejemplo, epítopes del dominio de unión al receptor (RBD) que inducen anticuerpos neutralizantes). Tal enfoque permite focalizar la respuesta hacia sitios conservados, reducir reacciones inespecíficas y modular la inducción de inmunidad humoral y celular balanceada, evitando a los epítopes que son altamente inmunogénicos, pero no protectores (Liu et al., 2024).

Por tanto, desde el punto de vista inmunológico, una vacuna multiepitópica ofrece la ventaja de focalizar la respuesta en los epítopes protectores. Cuando estos péptidos se presentan ensamblados en nanopartículas o conjugados a proteínas portadoras, se facilita su reconocimiento por células presentadoras de antígeno (APC), su procesamiento y presentación en contextos del MHC I/II para activar células T efectoras. En modelos animales se ha demostrado que nanopartículas que incorporan epítopes conservados del RBD y de la subunidad S2, ensambladas sobre esqueleto de ferritina, inducen respuestas humorales y celulares robustas, con generación sostenida de anticuerpos neutralizantes y activación de linfocitos T productores de IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10 (Liu et al., 2024).

El diseño de vacunas multiepitópicas enfrenta retos importantes como la generación de una respuesta inmunogénica limitada, esto se puede deber, en primer caso, a la baja complejidad estructural y a la ausencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que disparen señales innatas robustas, y en segundo caso, debido a que la producción recombinante exige plegamiento adecuado y control de la agregación para preservar epítopes conformacionales. Además, péptidos cortos o dominios parciales pueden degradarse con rapidez en el espacio extracelular, disminuyendo su biodisponibilidad antigénica (Scheiblhofer et al., 2017).

Para mitigar estas limitaciones la selección de epítopes debe considerar la capacidad de estos para inducir una respuesta inmune con buen grado de cobertura frente a variantes y garantizar la estabilidad estructural y la presentación en el huésped. Las herramientas inmunobioinformáticas actualmente disponibles ofrecen una aproximación relativamente efectiva para identificar epítopes B y T con potencial protector a la

vez que se descartan aquellos con potencial alergénico, lo cual impulsa el diseño de estas vacunas. En el contexto del SARS-CoV-2, se han propuesto diseños que combinan epítopes de la proteína S con epítopes T conservados, a fin de adelantar en el desarrollo de vacunas contra variantes emergentes (Rafi et al., 2022).

De igual manera, estas limitaciones han motivado el uso de acarreadores y adyuvantes que incrementen la captura por células presentadoras, favorezcan la cooperación T-dependiente y dirijan perfiles Th1/Th2/TFH acordes con el objetivo de protección (Chai, 2021). En este contexto, el fragmento C de la toxina tetánica (TTC), del dominio Hc no tóxico, ha cobrado relevancia como acarreador e inmunopotenciador. Modelos preclínicos muestran que TTC conserva epítopes T promiscuos capaces de actuar como “ayuda” para antígenos fusionados, incrementando la inmunidad humoral y celular. También, la inclusión del epítipo P2 de la toxina de tétanos (TT) en plataformas recombinantes ha aumentado de forma significativa la inmunogenicidad en distintos sistemas (Bayart et al., 2022). Este efecto se ha interpretado como un adyuvante funcional ya que TT/TTC no activan directamente a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como el hidróxido de aluminio, el MF59 o los oligodesoxinucleótidos (CpG) pero aprovecha la memoria T preexistente y la promiscuidad de unión a HLA-DR para mejorar la cooperación B y T y la formación de centros germinales. Así, fusionar antígenos pobres con dominios TT/TTC puede elevar títulos y calidad de anticuerpos, y potenciar la respuesta celular en escenarios donde la subunidad por sí sola sería insuficiente (Wen et al., 2014).

En términos de adyuvantes, el hidróxido de aluminio sigue siendo una opción clásica por su perfil de seguridad y su capacidad de promover respuestas humorales robustas, especialmente útiles cuando el objetivo primario es inducir generación de IgGs séricos. Sin embargo, en antígenos de baja complejidad estructural, el hidróxido de aluminio puede resultar insuficiente para alcanzar una respuesta inmune elevada si la presentación conformacional y la densidad epitópica no se han optimizado, o si no se combina con agonistas de PRR (por ejemplo, TLR) que provean señales innatas complementarias). Debido a esto los datos de respuesta humoral (ELISA de IgG, títulos y

avidez) debe ser contextualizados tomando en cuenta la arquitectura del antígeno, así como la dosis y el intervalo usando en el esquema de inmunización, además de considerar la posibilidad de reactividad cruzada cuando se comparan proteínas recombinantes equivalentes o comerciales de referencia (Scheiblhofer et al., 2017) (Bayart et al., 2022).

El blanco antigénico más explorado para SARS-CoV-2 es la proteína Spike (S), que concentra epítopes neutralizantes en el dominio RBD y regiones conservadas en S2. Los diseños multiepitópicos permiten combinar secciones dirigidas a B y T de regiones clave, con la expectativa de ampliar la cobertura frente a variantes y sostener una protección por largo tiempo. No obstante, la arquitectura del antígeno (orden, espaciamiento, longitud y tipo de linkers usados), su conformación post-expresión y la formulación (adyuvante, dosis e intervalo) determinan la magnitud y la calidad de la respuesta inducida. De hecho, la inmunogenicidad real de una subunidad fusionada depende tanto de la accesibilidad de epítopes como de la posible competencia con epítopes del portador o acarreador. Se ha descrito la llamada “supresión epitópica inducida por portador” en vacunas conjugadas multivalentes, lo que obliga a diseñar con cuidado la densidad relativa de epítopes del antígeno principal y del acarreador (Jegerlehner et al., 2010). En consecuencia, decisiones como posición de epítopes, linkers, orientación N-/C-terminal son, en realidad, inmunológicamente críticas.

Desde la perspectiva de accesibilidad tecnológica, la expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*) ofrece ventajas de costo, productividad y escalabilidad. Aunque la acumulación en cuerpos de inclusión obliga a rutas de solubilización y replegamiento y aumenta el riesgo de agregación y pérdidas durante cambios de buffers, una vez optimizado y estandarizado, el replegamiento resulta reproducible y transferible a escala industrial (De Marco et al., 2019). Para mejorar la recuperación y la homogeneidad, se recomiendan ajustes de fuerza iónica, co-solventes y pasos cromatográficos extra, además de control de endotoxina, la elección de condiciones de inducción (temperatura, inductor) y coexpresión de chaperonas son claves de proceso que impactan en la fracción soluble y en la calidad final del antígeno (De Marco et al., 2019). Aun con la

desventaja del replegamiento, *E. coli* permanece como un sistema atractivo para prototipos multiepitópicos que aspiran a establecerse como una alternativa vacunal a las plataformas ya establecidas.

Con base en lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis: una proteína quimérica fusionada al fragmento C de la toxina de tétanos permite la inducción de respuestas humorales específicas hacia epítopes de la proteína S del SARS-CoV-2 en el modelo de ratón BALB/c. El objetivo general fue doble, diseñar y producir en *E. coli* la proteína multiepitópica TTC-mep y evaluar su inmunogenicidad con ensayos serológicos. Específicamente se seleccionaron epítopes de S, se construyó y expresó el gen en un vector adecuado, se optimizó la recuperación y purificación, y se midió la respuesta humoral en BALB/c bajo condiciones controladas.

2 Antecedentes

2.1 SARS-Cov-2 y su epidemiología

Los coronavirus son un grupo de virus caracterizados por causar enfermedades infecciosas del tracto respiratorio en animales y humanos, desde resfriados comunes, como en los casos de HCoV-NL63, HCoV-229E, Beta-CoV1 y HCoV-HKU1 (Song et al., 2019), hasta cuadros clínicos graves, como el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), identificado por primera vez en 2012, y el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV), detectado en humanos en 2002 (Wit et al., 2016).

En 2019, en la provincia de Wuhan, China, se identificó por primera vez el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo tipo 2 (SARS-CoV-2), responsable de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (Zhu et al., 2020). Este es un virus envuelto perteneciente a la familia *Coronaviridae*, estrechamente relacionado con el MERS y el SARS-CoV. Posee un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva no segmentado, con al menos 13 marcos de lectura abiertos que generan más de una proteína madura partiendo de un solo polipéptido. SARS-CoV-2 está compuesto

principalmente por cuatro proteínas estructurales, además de una ARN polimerasa dependiente de ARN, una helicasa y dos tipos de proteasas. Posee también una envoltura que contiene a la glicoproteína Espícula (proteína S) que le confiere estructura y estabilidad (Santos-López et al., 2021).

Los primeros casos de infección por SARS-CoV-2 fueron reportados en la provincia de Hubei, en Wuhan, China, a finales de 2019 (Worobey et al., 2021). A partir de entonces, el virus se propagó a diferentes provincias de dicho país. Para inicios de 2020, la enfermedad ya se había extendido a diversas regiones del mundo, con un impacto significativo en Europa, particularmente en países como Italia y Francia. El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró oficialmente a la COVID-19 como una pandemia debido a los niveles alarmantes de contagios y decesos causados por esta enfermedad (WHO, 2020).

En México, el primer caso importado de COVID-19 se registró el 27 de febrero de 2020 en un hombre proveniente de Italia (Secretaría de Salud, 2020). A partir de entonces, y debido a la llegada de múltiples casos importados, principalmente desde Europa, Estados Unidos y Asia, la enfermedad se diseminó por todo el territorio mexicano. Entre 2020 y 2022, se identificaron cuatro olas de contagios significativos en el país, siendo la de enero de 2022 la más relevante en términos de casos confirmados, mientras que la de febrero de 2021 registró el mayor número de muertes (Secretaría de Salud, 2022).

En 2025 la secretaria de salud de México reportó una tasa de letalidad de la COVID-19 del 2.9% (Secretaría de Salud, 2025). Dicha tasa varía en función de la edad del paciente, la presencia de comorbilidades como hipertensión o diabetes, e incluso factores étnicos (Lara, 2021). Hasta inicios de 2025, según la Organización Mundial de la Salud, se han registrado más de 193 millones de casos acumulados de COVID-19 en América y más de 280 millones en Europa, con un total de aproximadamente 3 millones y 2.2 millones de muertes, respectivamente (Our World in Data, 2025). Sin

embargo, la cifra real podría ser mayor debido a la presencia de casos asintomáticos no detectados y a la falta de pruebas diagnósticas (WHO, 2025).

2.2 Estructura y mecanismos de infección

El conjunto de proteínas que conforman al SARS-CoV-2 se puede clasificar en dos grupos principales: proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales derivan de la proteólisis de las poliproteínas pp1a y pp1ab, codificadas en los marcos abiertos de lectura ORF1a y ORF1b en el extremo 5', dando lugar a las proteínas nsp1 a nsp16. Dentro de este grupo, las proteínas nsp12, nsp13 y nsp14 desempeñan funciones esenciales en los procesos de transcripción y replicación del virus. Por otro lado, se ha reportado que las proteínas nsp6, nsp7 y nsp8 podrían jugar un papel clave en la evasión del sistema inmunológico (Pastrian-Soto, 2020).

En cuanto a las proteínas estructurales, se encuentran la proteína Spike (S), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E), la nucleocápside (N) y la hemaglutinina esterasa (HE). La proteína de membrana (M) posee tres dominios transmembranales y participa principalmente en la conformación y estabilidad del virión al interactuar con la proteína de E y la proteína S en la membrana lipídica (Pastrian-Soto, 2020).

La proteína de envoltura (E), con un tamaño de 75 aminoácidos, desempeña un papel fundamental en el ensamblaje y liberación del virus, así como en la formación de canales iónicos a través de la membrana lipídica. Esta función es posible gracias a su ectodominio N-terminal y su endodominio C-terminal, siendo una característica relevante en la patogénesis de la enfermedad (Arandia-Guzmán & Antezana-Llaveta, 2020).

Por otro lado, la proteína de nucleocápside (N) está estrechamente asociada con el ARN viral, al cual se une mediante sus dos dominios, el NTD (dominio N-terminal) y el CTD (dominio C-terminal), otorgándole protección y organización al asociarse con las secuencias reguladoras de transcripción. Además, tiene la capacidad de

interactuar con la proteína nsp3, anclando el ARN viral al complejo de transcripción y replicación (RTC), lo que facilita su replicación y transcripción. Asimismo, al unirse a la proteína M, promueve el empaquetamiento del ARN viral dentro de las partículas virales recién formadas (Arya et al., 2021).

Se ha reportado que la hemaglutinina esterasa (HE) mejora la entrada del virus a las células huésped y facilita su diseminación a través de las mucosas debido a su actividad acetiltransferasa, esto a través de su unión a los ácidos siálicos presentes en las glicoproteínas de superficie (Arandia-Guzmán & Antezana-Llaveta, 2020).

Por último, la glicoproteína S es de gran interés en el diseño de vacunas contra el SARS-CoV-2. Con un tamaño aproximado de 150 kDa, está conformada por dos homodímeros altamente glicosilados mediante enlaces N-glicosídicos y asociados a la proteína N. Esta proteína otorga al coronavirus su característica estructura de espiga, ya que sobresale de la superficie viral. Su secuencia N-terminal es fundamental para su transporte al retículo endoplasmático (Arya et al., 2021). La proteína S es la principal responsable de la entrada del virus en la célula huésped. Para ello, se escinde en dos subunidades mediante la acción de proteasas celulares similares a la furina. La subunidad S1 contiene el RBD, que interacciona con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), mientras que la subunidad S2 forma el tallo de la proteína y es responsable de la fusión con la membrana celular (Pastrian-Soto, 2020). Cuando la subunidad S1 se acopla a su receptor ACE2, la subunidad S2 sufre un cambio conformacional que expone su péptido de fusión, permitiendo la unión de la membrana celular con la membrana viral. Sin embargo, antes de esto es necesario un procesamiento enzimático de la proteína S, mediado por diversas proteasas. La furina escinde la proteína S en sus subunidades S1 y S2 durante la maduración viral, mientras que TMPRSS2 y las catpsinas procesan la subunidad S2 para exponer el péptido de fusión y activar la entrada del virus (Pastrian-Soto, 2020).

La capacidad del virus para infectar un tejido específico en el cuerpo humano está determinada principalmente por la presencia del receptor ACE2 en las células de dicho

tejido. Las principales zonas de infección del virus se encuentran en el tracto respiratorio, tanto superior como inferior. En la cavidad nasal, el virus puede infectar las células caliciformes o células de Goblet, responsables de la producción de moco, así como las células ciliadas. En los pulmones, el SARS-CoV-2 tiene la capacidad de replicarse en los neumocitos tipo II y en las células epiteliales bronquiales, aunque en menor medida (Pastrian-Soto, 2020).

A pesar de que la COVID-19 se considera principalmente una enfermedad de las vías respiratorias, la amplia distribución del receptor ACE2 en diferentes tejidos del cuerpo humano permite que el virus infecte diversos órganos y sistemas. Se ha reportado, por ejemplo, la infección de enterocitos en el intestino delgado. Asimismo, se ha observado que el virus puede infectar el tejido cardíaco, los riñones, el tejido hepático y el sistema nervioso central (Pastrian-Soto, 2020). Lo anterior resulta en daños en dichos tejidos y se asocia con las secuelas sistémicas tras la infección por SARS-CoV-2.

2.3 Respuesta inmune ante el virus

Frente a la entrada del virus al organismo, se desencadenan diversas respuestas inmunitarias para combatir la infección. En primera instancia, células del sistema inmunológico innato, como las células dendríticas y los macrófagos, detectan el virus mediante el reconocimiento de PAMPs a través de los PRRs (Coutiño Rodríguez, 2023).

A partir de este reconocimiento, dichas células desencadenan la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), las cuales contribuyen a la promoción y coordinación de la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que los pacientes con COVID-19 presentan niveles elevados de ciertos marcadores inflamatorios, principalmente proteína C reactiva, ferritina y procalcitonina, siendo estos valores más altos en los casos de mayor gravedad (Hou et al., 2020).

Una respuesta inmune innata descontrolada y exacerbada puede promover el desarrollo de COVID-19 grave, particularmente en pacientes con comorbilidades o en aquellos con una predisposición genética a una mayor activación inflamatoria. En estos casos, la respuesta inmune innata, mediada por células como los macrófagos y neutrófilos, genera una tormenta de citocinas. Este fenómeno se caracteriza por un aumento descontrolado de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, las cuales contribuyen a la inflamación sistémica y a la disfunción de órganos. La tormenta de citocinas puede llevar a lesiones pulmonares, edema pulmonar y falla respiratoria, que son características de los casos graves de COVID-19. El exceso de citoquinas inflamatorias también puede inducir la activación de las vías de piroptosis, un tipo de muerte celular programada inflamatoria, que exagera aún más la inflamación y el daño tisular (McGonagle, O'Donnell, Sharif, Emery, & Bridgewood, 2020).

Además, se ha observado que la disfunción del sistema endotelial y la hipercoagulabilidad son mecanismos clave en el desarrollo de complicaciones graves, como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y la trombosis. Los pacientes graves presentan alteraciones en la permeabilidad vascular y una activación endotelial generalizada, lo que favorece la formación de microtrombos y contribuye a la progresión de la enfermedad. (Xu, Ilyas, & Weng, 2022)

La respuesta inmune adaptativa contra el virus está mediada por la activación de linfocitos T y linfocitos B. Los pacientes con COVID-19 generan una respuesta de linfocitos T CD4+ cooperadores y CD8+ citotóxicos. En conjunto, estas células permiten una respuesta coordinada y compleja contra la infección, eliminando las células infectadas y activando a los linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos contra el patógeno (Hou et al., 2020). En contraste, se ha observado que los pacientes con cuadros graves de COVID-19 presentan linfopenia, es decir, una disminución significativa en el conteo de linfocitos T, lo que podría traducirse en una respuesta inmune comprometida (Chen & Wherry, 2020).

Dentro de la respuesta inmune adaptativa, la respuesta humoral constituye una parte fundamental y está mediada por la activación de linfocitos B específicos contra el patógeno. Durante los primeros 15 días de la infección, los pacientes generan principalmente inmunoglobulinas A (IgA) e inmunoglobulinas M (IgM) dirigidas contra las proteínas S y N, alcanzando su punto máximo al final de la segunda semana posterior al inicio de los síntomas. Posteriormente, los niveles de estos anticuerpos disminuyen, dando paso gradualmente a la producción de inmunoglobulinas G (IgG). Estas suelen ser detectables entre los días 10 y 14 después del inicio de los síntomas, alcanzan su pico máximo entre las 3 y 4 semanas, y pueden mantenerse en títulos elevados durante varios meses o incluso años, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de la generación de células B de memoria (Galipeau et al., 2020).

Diferentes subtipos de inmunoglobulina G (IgG) se generan como parte de la respuesta humoral. Se ha identificado que IgG1 e IgG3 son los principales subtipos neutralizantes contra la proteína S del SARS-CoV-2 (Galipeau et al., 2020). Además, estas inmunoglobulinas participan en la activación del sistema del complemento y, al unirse a los receptores FcγRI (CD64) y FcγRIII (CD16) en macrófagos y células NK, promueven la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Se ha observado que las subclases de IgG, IgG1 e IgG3 tienen un efecto protector muy significativo contra el virus. Específicamente la IgG3 ha reportado una potencia neutralizante de hasta 50 veces mayor en comparación con otras subclases (Abebe & Asmamaw, 2023).

En términos generales, las inmunoglobulinas G desempeñan un papel indispensable en la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2, ya que contribuyen a la neutralización del virus, la activación del sistema del complemento, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la generación de memoria inmunológica. Lumley (2021) y colaboradores reportaron una reducción del riesgo de reinfección durante al menos 6 meses en individuos con títulos elevados de anticuerpos IgG anti-S, correlacionando estos niveles con la protección contra la enfermedad a largo plazo.

Este conjunto de acciones coordinadas por el sistema inmune permite, en la mayoría de los casos, la erradicación de la infección. Sin embargo, la eficacia de esta respuesta puede verse comprometida por factores como la edad y la presencia de comorbilidades (Lara, 2021). Además, se ha observado que una mayor carga viral en el momento de la infección puede inducir una respuesta inmune más intensa, lo que podría derivar en una evolución clínica más grave (Vega-de LoPresti et al., 2022). Asimismo, el surgimiento de nuevas variantes del virus puede disminuir la eficacia de la respuesta inmune, ya que algunas de ellas tienen la capacidad de evadir la acción de los anticuerpos neutralizantes generados en infecciones previas.

2.4 Vacunas contra COVID-19

Desde el inicio de la pandemia causada por SARS-CoV-2, el desarrollo de vacunas se convirtió en una prioridad mundial para mitigar la morbilidad y mortalidad. En diciembre de 2020 se autorizó el uso de emergencia de la vacuna de Pfizer-BioNTech en Estados Unidos, marcando un hito en el desarrollo rápido de vacunas para hacer frente a patógenos emergentes, lo cual representa retos no sólo científicos sino regulatorios y de financiamiento (Mayo Clinic, 2022). En los meses siguientes, otras plataformas como las vacunas de Moderna, AstraZeneca/Oxford, Sinovac, Sputnik V y Janssen también recibieron autorizaciones de uso de emergencia, ampliando el arsenal global frente al virus (PAHO, 2024). A lo largo del año 2021 y 2022 se otorgaron licencias completas o ampliadas a algunas de estas vacunas, conforme se acumulaban más datos de seguridad y eficacia (Mayo Clinic, 2022).

Las vacunas contra COVID-19 pueden clasificarse según la tecnología empleada para inducir una respuesta inmune protectora. Entre las principales plataformas destacan: vacunas de ácido nucleico (ARN mensajero, mRNA), vacunas basadas en vectores virales, vacunas de virus inactivados y de subunidades proteicas (o recombinantes). Las vacunas de mRNA (por ejemplo, Pfizer-BioNTech y Moderna) se fundamentan en la administración de RNA con la meta de que las células del hospedero sinteticen la

proteína S del virus y desencadenen una respuesta inmunitaria sin usar el virus completo. Las vacunas basadas en vectores usan virus modificados (por ejemplo, adenovirus no replicantes) para introducir genes del SARS-CoV-2 a las células diana, con la consecuente producción de dicho antígeno. Las vacunas de subunidades contienen proteínas virales purificadas o partes de ellas (usualmente la proteína S) e incluyen adyuvantes para incrementar la inmunogenicidad (Kudlay, Svistunov, & Satyshev, 2022). En muchos países, las plataformas de virus inactivado, como las de Sinopharm o Sinovac, también fueron usadas ampliamente, especialmente en contextos con menor capacidad para el desarrollo de vacunas recombinantes (PAHO, 2024)

El impacto de la vacunación contra COVID-19 en la pandemia ha sido sustancial. La difusión global de dosis vacunales ha ralentizado las tasas de hospitalización y muerte, al menos en las olas dominadas por variantes sensibles. Según datos de Our World in Data 2024, desde el inicio de la campaña se han administrado miles de millones de dosis globalmente. Estas campañas masivas también contribuyeron a la reducción de la presión en los sistemas sanitarios y facilitaron la reapertura progresiva de actividades sociales y económicas. No obstante, la emergencia de nuevas variantes con mutaciones en la proteína S ha retado la eficacia de las vacunas originales, obligando a actualizaciones de formulaciones y dosis de refuerzo periódicas (Kalinke et al., 2022). Por otro lado, dado que la respuesta inmune decae con los años, se recomienda tener refuerzos anuales para mantener la inmunidad.

El cronograma de aprobación de estas vacunas se aceleró debido a la crisis sanitaria, se optimizaron procesos regulatorios, se adaptaron fases de ensayo y se utilizaron datos acumulados en tiempo real para la toma de decisiones. Por ejemplo, en 2020 la FDA otorgó aprobación completa a la vacuna de Pfizer-BioNTech, bajo el nombre “Comirnaty” para personas de 16 años en adelante (Kalinke et al., 2022). En etapas posteriores, se autorizaron formulaciones adaptadas para nuevas variantes y se mantuvo la autorización de emergencia mientras se evaluaban nuevas versiones de la vacuna (CDC, 2024)

2.5 Vacunas basadas en proteínas y multiepitópicas

Las vacunas basadas en proteínas y multiepitópicas representan una estrategia innovadora en la lucha contra enfermedades virales, como la COVID-19. Estas vacunas están diseñadas para inducir respuestas inmunológicas amplias al presentar múltiples epítomos del patógeno. En el caso del SARS-CoV-2, la proteína S ha sido el principal objetivo para el diseño de vacunas. Por ejemplo, la vacuna CHIVAX 2.1 utiliza un conjunto de diez péptidos inmunogénicos provenientes del RBD de varias variantes del virus, incluidas Delta y Omicron. Esta vacuna demostró una efectividad significativa en la inducción de anticuerpos neutralizantes y respuestas inmunológicas tanto humoral como celular en modelos murinos (Vega Rojas et al., 2024).

De manera similar, un estudio reciente que evaluó la efectividad de la proteína quimérica LTP50, diseñada también a partir del RBD, demostró que esta vacuna inducía respuestas inmunológicas tanto humoral como celular. En particular, se observó que LTP50 era capaz de generar anticuerpos neutralizantes potentes contra la variante BA.5 del virus. Este hallazgo resalta la capacidad de la proteína quimérica para activar tanto la respuesta de anticuerpos, como la respuesta de células T, lo que sugiere su potencial como candidato para una vacuna eficaz contra las variantes emergentes del SARS-CoV-2 (Wong-Arce et al., 2024).

Otro ejemplo de esto es la vacuna SCB-2019, desarrollada por Clover Biopharmaceuticals, basada en una proteína S recombinante y estabilizada en su conformación de prefusión, la cual ha sido evaluado en ensayos clínicos fase 2 y 3 con resultados prometedores, demostrando una eficacia del 67.2 % frente a casos totales de COVID-19, así como una seguridad alta (Bravo et al., 2022). Otro caso es la vacuna ZF2001, basada en el dímero de RBD, que en estudios clínicos demostró seguridad y eficacia frente a formas sintomáticas y graves durante al menos seis meses (Dai et al., 2022).

Una revisión de la literatura actual revela que las vacunas de subunidades representan una plataforma madura para la producción de vacunas eficaces y seguras para hacer frente a las variantes. Sin embargo, el uso de vacunas multiepitópicas ha sido limitado

y representa un nicho de posibles innovaciones al ofrecer una estrategia que permita una mejora en la eficacia a largo plazo mediante diseños basados en epítopes conservados y el uso de acarreadores inmunogénicos que permitan la inducción de inmunidad a largo plazo. Los retos en estos diseños abarcan la selección de adyuvantes adecuados o estrategias de entrega eficientes y la selección de los epítopes más relevantes para lograr tal meta (Heidary et al., 2022). En ese sentido, las vacunas multiepitópicas pueden considerar esquemas donde se combinen diferentes plataformas y esquemas de inmunización para ampliar tanto la magnitud como la calidad de la respuesta (Zhang et al., 2022)

2.7 Respuesta Inmune adaptativa y mecanismos de protección inducidos por vacunas

Las vacunas están diseñadas para imitar una infección controlada que inicie la inmunidad innata y posteriormente la respuesta inmune adaptativa de modo que se generen anticuerpos neutralizantes, células T efectoras y células de memoria capaces de prevenir infección o enfermedad grave ante exposiciones futuras. En general, la mayoría de estos biofármacos logran protección clínica a través de anticuerpos séricos o mucosales que bloquean la infección. Estos anticuerpos, en cantidad y calidad adecuadas, constituyen la base de la protección de numerosas vacunas (Plotkin, Orenstein, Offit, & Edwards, 2024). En la COVID-19, diferentes análisis han mostrado que los títulos de anticuerpos neutralizantes se asocian estrechamente con la protección frente a la enfermedad severa y, en menor nivel, contra la infección (Khoury et al., 2021). No obstante, la inmunidad celular contribuye de manera decisiva a limitar la progresión de la enfermedad y a proporcionar una respuesta amplia frente a diferentes variantes, por lo que la protección inducida por vacunas resulta del trabajo sinérgico de la respuesta humoral y celular (Barouch, 2022)

Al inicio de la respuesta inmune, la protección depende de la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa en el sitio de inyección y en los ganglios linfáticos de

drenaje. Ahí los adyuvantes y los patrones moleculares asociados a patógenos, activan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en células dendríticas y otras APC, lo que promueve la generación de citocinas y quimiocinas, la maduración celular, el aumento de moléculas MHC y la migración hacia los ganglios (Asociación Española de Pediatría, 2024).

Una vez en los ganglios, estas señales condicionan la polarización de las células T $CD4^+$, favoreciendo respuestas Th1 frente a patógenos virales y la diferenciación de células T foliculares cooperadoras (Tfh). Estas últimas dirigen las reacciones en los centros germinales donde se define la magnitud, la afinidad y la persistencia de la respuesta humoral mediante la generación de células inmunes de larga vida y células B de memoria (Asociación Española de Pediatría, 2024).

En la rama humoral, tras la presentación antigénica y la cooperación de células T foliculares cooperadoras (Tfh), los centros germinales posibilitan el cambio de isotipo, la hipermutación somática y la selección de clones de mayor afinidad. De este proceso surgen plasmocitos de larga vida residentes en la médula ósea y células B de memoria capaces de responder con rapidez ante una reexposición al antígeno (Asociación Española de Pediatría, 2024).

En humanos vacunados con plataformas contra SARS-CoV-2 se han documentado respuestas de centros germinales persistentes, así como una cooperación entre Tfh y células B específicas de la proteína S/RBD. Esto pudiera explicar la progresiva mejora en la potencia y amplitud de los anticuerpos tanto con el tiempo como tras dosis de refuerzo (Turner et al., 2021)

A nivel mucosal, estudios han señalado un papel relevante de las respuestas tempranas de IgA neutralizante, particularmente en vías respiratorias. Este hallazgo sugiere que la inducción de anticuerpos en mucosas podría contribuir a limitar la replicación inicial del virus y reducir la transmisión (Sterlin et al., 2021).

La inmunidad mediada por células T constituye otro pilar de protección. Las células T CD8⁺ citotóxicas eliminan células infectadas, mientras que las CD4⁺ Th1 favorecen respuestas antivirales efectivas y apoyan a las células B. Esta respuesta reconoce epítopes más conservados y se mantiene frente a variantes, disminuyendo el riesgo de enfermedad grave aún con la disminución de anticuerpos neutralizantes (Moss, 2022). De manera complementaria, las células T de memoria residentes en tejidos de pulmón y mucosas promueven una respuesta rápida en el sitio y limita la diseminación, lo que las convierte en un objetivo clave de nuevas vacunas para patógenos respiratorios (Zheng et al., 2022).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se han identificado como indicadores de protección contra COVID-19 grave. En el análisis de Carpp et al. (2024), se observó que la eficacia de la vacuna Ad26.COV2.S contra COVID-19 grave aumentaba con el nivel de anticuerpos neutralizantes. La protección contra la enfermedad grave aumentó de un 63.1% en individuos con títulos indetectables (<4.8975 IU50/ml) a un 85.2% en aquellos con títulos apenas cuantificables (5.2 IU50/ml). Además, los individuos en el percentil 90 de títulos (30.2 IU50/ml) mostraron una eficacia del 95.1%. Estos datos sugieren que niveles más bajos de anticuerpos neutralizantes pueden ofrecer protección contra la enfermedad grave, mientras que niveles más altos podrían ser necesarios para prevenir la infección.

La durabilidad y la calidad de la protección dependen de varios factores como la magnitud y afinidad de anticuerpos neutralizantes, la amplitud de reconocimiento, robustez de memoria B y T y microambiente generado por adyuvantes y formulación (Asociación Española de Pediatría, 2024). En el caso de vacunas de subunidades proteicas y multiepitópicas estos elementos son especialmente críticos ya que requieren adyuvantes potentes que promuevan respuestas sostenidas, y estrategias de presentación que optimicen el diseño del antígeno (Pulendran, Arunachalam, & O'Hagan, 2021)

2.8 Adyuvantes para vacunas

Los adyuvantes son componentes esenciales en numerosas vacunas modernas, diseñados para potenciar la inmunogenicidad del antígeno administrado. Su función central es modular la respuesta inmune innata en el sitio de inyección, promoviendo la activación de células presentadoras de antígeno y facilitando el desarrollo de respuestas adaptativas más robustas y duraderas (Awate et al., 2013). Esto resulta particularmente importante en vacunas de subunidades proteicas o epitópicas, que por sí solas suelen presentar baja inmunogenicidad debido a la ausencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Mekonnen, Kassa, & Tadesse, 2021).

Los mecanismos de acción de los adyuvantes incluyen la prolongación de la disponibilidad del antígeno, la promoción de inflamación local y producción de citocinas y quimiocinas que reclutan células inmunes, así como la estimulación de los PRR, como los Toll-like receptors (TLR) o NOD-like receptors (NLR), desencadenando señales que favorecen la maduración de células dendríticas y la polarización de linfocitos T (O'Hagan & Fox, 2015).

Entre los adyuvantes más utilizados destaca el hidróxido de aluminio, introducido en 1926 y aun ampliamente empleado en vacunas humanas, este adyuvante favorece una respuesta predominantemente de tipo Th2 e incrementa la producción de anticuerpos (Reed et al., 2013). Otros ejemplos relevantes incluyen MF59, una emulsión de aceite en agua utilizada en vacunas contra influenza que estimula quimiotaxis celular; AS03, otra emulsión oleosa con escualeno y α -tocoferol, aplicada en vacunas pandémicas; y CpG oligodesoxinucleótidos, que activan TLR9 y potencian respuestas Th1. Más recientemente, se han diseñado adyuvantes basados en nanopartículas y liposomas que facilitan la entrega del antígeno, con capacidad para direccionar la respuesta hacia perfiles específicos (Ko & Kang, 2018) (Garçon, Vaughn, & Didierlaurent, 2012) (Shirota, 2017)

En el contexto de SARS-CoV-2, los adyuvantes han sido críticos para el éxito de plataformas de subunidades proteicas. Vacunas como Novavax (NVX-CoV2373) utilizan

la matriz adyuvante Matrix-M, un complejo de saponinas en nanopartículas que promueven una respuesta humoral y celular equilibrada, demostrando eficacia comparable a vacunas mRNA (Heath et al., 2021). Del mismo modo, candidatos como SCB-2019 han empleado combinaciones de adyuvantes (CpG 1018 + alumbre) que permiten alcanzar inmunogenicidad competitiva con plataformas más innovadoras (Bravo et al., 2022)

Los adyuvantes no solo amplifican la magnitud de la respuesta inmune, sino que también influyen en su calidad y durabilidad y pueden orientar la respuesta hacia inmunidad humoral o celular, la generación de memoria y la amplitud de protección frente a variantes. Este papel central los convierte en un componente indispensable para el diseño de vacunas epitópicas, donde la potencia inmunogénica del antígeno aislado requiere ser complementada por otro estímulo inmunológico (Pulendran, Arunachalam, & O'Hagan, 2021).

2.9 Toxoide tetánico y TTC como adyuvantes y acarreadores

El toxoide tetánico es la forma detoxificada, estable e inmunogénica de la toxina tetánica que se emplea desde hace décadas en vacunas humanas como proteína portadora (carrier) en vacunas conjugadas como la Hib, meningocócicas y neumocócicas. Al conjugar polisacáridos capsulares a un carrier proteico como TT, un antígeno originalmente T-independiente se transforma en T-dependiente, con generación de anticuerpos de alta avidéz y memoria inmunológica eficaz en lactantes y otros grupos vulnerables (WHO, 2023) (WHO, 2025). Esta explica el éxito de las vacunas conjugadas en la reducción drástica de enfermedad invasiva por bacterias encapsuladas.

Desde el punto de vista del mecanismo, la proteína portadora aporta epítopes T CD4⁺ “universales” que proveen ayuda a linfocitos B específicos, en este caso del polisacárido, habilitando centros germinales, cambio de isotipo e hipermutación somática. En el caso de TT, se han caracterizado epítopes como el P2 (TT830–844) y P30, con capacidad de unirse a múltiples alelos HLA-DR y de ser reconocidos en la mayoría de

los individuos previamente expuestos o vacunados. Estos epítopes TT pueden potenciar subunidades recombinantes o antígenos pobres incrementando títulos de anticuerpos y la calidad de la respuesta (Wen et al., 2014).

Estructural y funcionalmente acoplamiento y accesibilidad de epítopes condicionan la magnitud y durabilidad de la respuesta. Un desafío conocido es la “supresión epitópica inducida por portador” (CIES), la inmunidad preexistente frente al carrier puede desviar la respuesta hacia epítopes del portador y atenuar la inmunidad frente al antígeno principal, fenómeno documentado en vacunas conjugadas multivalentes (Jegerlehner et al., 2010)

Junto al TT completo, han cobrado relevancias variantes genéticamente detoxificadas y versiones optimizadas como 8MTT, evaluados como alternativas portadoras con inmunogenicidad comparable y ventajas de proceso (Chang et al., 2022).

Por otro lado, el TTC, correspondiente al dominio no tóxico Hc (~50 kDa), ha demostrado propiedades de inmunopotenciación en configuraciones de fusión o coexpresión. Modelos preclínicos muestran que TTC conserva epítopes T promiscuos, capaces de actuar como un ayudante para antígenos fusionados, elevando tanto la inmunidad humoral como celular (Bayart et al., 2022). En rotavirus recombinante la inclusión del epítopo P2 de TT incrementó significativamente la inmunogenicidad (Wen et al., 2014).

Se ha sugerido que el papel de TT y TTC puede entenderse como un “adyuvante funcional” ya que no activan directamente receptores innatos como los adyuvantes clásicos (alumbre, MF59, CpG), pero su memoria T preexistente y promiscuidad de epítopes da un efecto potenciador, especialmente con vacunas proteicas o epitópicas, donde el antígeno requiere ayuda externa (Avci & Kasper, 2019) (Pichichero, 2013).

3 Justificación

El acceso oportuno y equitativo a vacunas durante crisis sanitarias es fundamental para contener su propagación, pero en países de renta media y baja, como México, la

producción local enfrenta limitaciones tecnológicas y económicas. Durante la pandemia de COVID-19, estas dificultades se reflejaron en retrasos y dependencia de importaciones, evidenciando la necesidad de desarrollar plataformas vacunales accesibles y adaptables. En este contexto, las vacunas basadas en proteínas representan una alternativa viable por su menor costo, facilidad de almacenamiento y requerimientos de infraestructura más sencillos que las tecnologías de ARN o virus atenuados.

No obstante, las vacunas de subunidades presentan baja inmunogenicidad y requieren estrategias que mejoren la presentación del antígeno. El uso del fragmento C de la toxina tetánica como acarreador puede potenciar la respuesta inmune al actuar como un patrón molecular asociado a patógenos y facilitar la activación de linfocitos. Así, el desarrollo de una vacuna multiepitópica basada en la proteína S del SARS-CoV-2 acarreada por este fragmento se propone como una estrategia innovadora que no solo fortalecería la capacidad tecnológica nacional, sino que también contribuiría a la autonomía en la producción de biofármacos de respuesta rápida ante futuras emergencias sanitarias.

4 Hipótesis

Una proteína quimérica fusionada al fragmento C de la toxina de tétanos permite la inducción de respuestas humorales específicas hacia epítopes de la proteína S del SARS-CoV-2 en el modelo de ratón BALB/c

5 Objetivos

5.1 General

Diseñar y producir en *E. coli* recombinante una proteína multiepitópica TTC-mep contra el SARS-CoV-2 empleando el fragmento C de la toxina de tétanos y determinar sus propiedades inmunogénicas en ratones BALB/c.

5.2 Específicos

- Seleccionar epítopes relevantes de la proteína Spike del SARS- Cov-2 para la inducción de respuestas humorales y celulares.
- Obtener el gen codificante de TTC-mep y construir un vector para su expresión en *E. coli*.
- Establecer las condiciones para la expresión de la TTC-mep.
- Estandarizar un proceso cromatográfico para la recuperación de la TTC-mep
- Determinar las propiedades inmunogénicas de la TTC-mep en ratones BALB/c en términos de respuesta humoral.

6 Material y métodos

6.1 Selección de epítopes y construcción del vector

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína S del SARS-CoV-2 a partir de la base de datos de la plataforma Protein Data Bank,. Posteriormente, mediante un análisis bioinformático utilizando las herramientas BepiPred-2.0 y NetMHCpan-4.0, se seleccionaron epítopes con potencial para inducir una respuesta inmunogénica tanto humoral como celular. Una vez definidos los epítopes, se procedió al diseño de una proteína multiepitópica, a la cual se le fusionó la secuencia correspondiente al fragmento C de la toxina del tétanos, así como un *linker* flexible de lisina. La secuencia de

ADN codificante para dicha proteína fue optimizada para su expresión en *Escherichia coli* utilizando el vector de expresión pET-15b.

6.2 Transformación de cepa bacteriana y expresión de la proteína

Se generaron células competentes de *Escherichia coli* cepa Rosetta (DE3), partiendo de 2 mL de un preinóculo de la misma cepa que se adicionó a 200 mL de medio LB (10 % de bacto-peptona, 5 % de extracto de levadura y 10 % de NaCl). Este se incubó a 37 °C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0.4 y 0.6. Posteriormente, el cultivo se colocó en un baño de hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 2800 $\times g$ durante 10 minutos a 4 °C. La pastilla de biomasa se lavó tres veces con una solución 0.1 M de $CaCl_2$ y se resuspendió en glicerol al 15 %, generando *stocks* de 50 μL para su almacenamiento a -80 °C.

La transformación de las células competentes se realizó mediante choque térmico. Para ello, los *stocks* en glicerol se descongelaron en hielo, se adicionaron 100 μg de ADN y se incubaron nuevamente en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se sometieron a una incubación a 42 °C durante 1 minuto, seguida de un retorno al baño de hielo por otros 15 minutos. A continuación, se agregaron 500 μL de medio LB y se incubó a 37 °C durante 60 minutos con agitación constante. La mezcla se sembró en placas de medio LB suplementadas con ampicilina (100 mg/L) para la selección de colonias transformadas. Para inducir la expresión de la proteína recombinante, se generaron preinóculos en medio LB correspondiente al 10 % del volumen final del cultivo, adicionados con ampicilina (100 mg/L) y cloranfenicol (40 mg/L), y se incubaron durante 24 horas a 37 °C con agitación constante. Posteriormente, el preinóculo se transfirió al volumen restante de medio LB, también suplementado con los mismos antibióticos en igual concentración, y se dejó crecer hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.6 y 0.8. En ese punto, se indujo la expresión mediante la adición de lactosa a la

concentración establecida (1 o 15 g/L), incubando durante el número de horas correspondientes a la corrida experimental.

6.3 Extracción de proteína soluble e insoluble

La biomasa de los cultivos se recuperó por centrifugación a 7000 ×g durante 10 minutos a 4 °C, con el fin de proceder a la lisis celular. La pastilla de biomasa se resuspendió en una solución hipertónica (100 mM de Tris-HCl, sacarosa al 20 % (p/v), pH 7.4) en una proporción de 1 mL por cada 100 mg de biomasa. Posteriormente, las células se recuperaron nuevamente por centrifugación bajo las mismas condiciones y se resuspendieron en una solución hipotónica (agua filtrada) en una proporción de 1 mL por cada 40 mg de biomasa. La lisis celular se llevó a cabo mediante ultrasonificación (dispositivo GEX130PB, Twinsburg, OH, EUA), aplicando 9 ciclos de sonicación de 30 segundos a una amplitud del 70 %, seguidos de 30 segundos de reposo, todo ello en un baño de hielo. Se tomó una alícuota del lisado celular, la cual se etiquetó como “proteína total”. El resto del lisado se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos para separar las proteínas agregadas en cuerpos de inclusión (fracción insoluble) de las proteínas solubles presentes en el sobrenadante. Tras la centrifugación, el sobrenadante se recolectó y se designó como “proteína soluble”, mientras que el precipitado se identificó como “cuerpos de inclusión”. Ambas fracciones se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.4 Lavados de cuerpos de inclusión

Para el análisis de la fracción insoluble, la pastilla correspondiente a los cuerpos de inclusión se resuspendió en solución hipotónica en la misma proporción previamente

utilizada. Posteriormente, se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, repitiendo este procedimiento dos veces más. Con el objetivo de eliminar restos celulares y proteínas contaminantes, la pastilla fue solubilizada en PBS 1× con Tritón X-100 al 1 %, en una relación de 2.5 mL por cada 50 mL de cultivo. Esta proporción se mantuvo constante en los siguientes pasos con diferentes soluciones tampón. La muestra fue sometida a ultrasonificación (Dispositivo GEX130PB Twinsburg, OH, EUA), aplicando de 6 a 9 ciclos de 30 segundos de sonicación al 70 % de amplitud, seguidos de 30 segundos de reposo, manteniéndose en todo momento en baño de hielo. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 20 minutos en hielo y se sometieron a una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones. Este proceso de lavado se repitió una vez más con PBS 1× + Tritón X-100 al 1 % y posteriormente con PBS 1× únicamente. Para la solubilización de los cuerpos de inclusión, la pastilla fue resuspendida en un tampón compuesto por 4 M de urea y 20 mM de fosfato, pH 7.4, y se sometió nuevamente a ultrasonificación, incubación y centrifugación bajo las mismas condiciones descritas previamente. El sobrenadante recuperado se etiquetó como fracción S4. El resto de la pastilla fue resuspendida en un segundo tampón compuesto por 8 M de urea, 20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl, pH 7.4. Esta suspensión se sometió a ultrasonificación y centrifugación para recuperar el sobrenadante, que se etiquetó como fracción S5. Finalmente, el residuo restante de la pastilla fue resuspendido nuevamente en el mismo tampón, sometido a ultrasonificación y dejado en incubación a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó y el sobrenadante recuperado se etiquetó como fracción S6. Todas las fracciones recuperadas (S4, S5 y S6) fueron almacenadas a -20 °C.

6.5 Purificación y replegamiento de la proteína

Las fracciones de proteína soluble, así como las derivadas de cuerpos de inclusión (S5 y S6), fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), utilizando una columna Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia

Biotechnology, Estocolmo, Suecia), cargada con iones Ni^{2+} y equilibrada previamente con buffer de unión. La muestra de proteína soluble fue resuspendida en un tampón compuesto por 20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl y pH 7.0, e inyectada en la columna en fracciones de 1 mL, a una velocidad de flujo de 0.025 mL/min. Las fracciones S5 y S6 fueron inyectadas bajo las mismas condiciones. La elución de las proteínas se realizó con un tampón de elución compuesto por 20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl, y 500 mM de imidazol, ajustado a pH 7.0. Se recolectaron tanto las fracciones adsorbidas como las no adsorbidas para su posterior análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). En el caso de las fracciones S5 y S6, se realizó un proceso de replegamiento proteico mediante diálisis, utilizando una membrana con un punto de corte molecular entre 6 y 8 kDa. Para el replegamiento, se emplearon secuencialmente los siguientes tampones: primero, un tampón de fosfato 20 mM con 4 M de urea, ajustado a pH 7.1; posteriormente, un tampón de carbonato 50 mM, complementado con 10 % (v/v) de glicerol y 0.01 % (v/v) de Tween 20, ajustado a pH 9.2; y finalmente, un tampón compuesto por 10 % (p/v) de sacarosa y 0.01 % (v/v) de Tween 20. Cada diálisis duró 24 horas a 4 °C.

6.6 Análisis SDS-PAGE y Western Blot

Para la evaluación de las diferentes fracciones proteicas, se realizaron análisis mediante electroforesis SDS-PAGE. Se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12 %, y las muestras se prepararon adicionando *buffer* de carga 5× (500 mM de DTT, 250 mM de Tris-HCl, 10 % (p/v) de SDS, 50 % (v/v) de glicerol y 0.1 % (p/v) de azul de bromofenol, pH 6.8) en una proporción 3:1 (v/v). La mezcla se desnaturalizó calentándola a 95 °C durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se corrieron a 160 V durante 1 hora y los geles se revelaron mediante tinción con azul de Coomassie.

Para evaluar la presencia de la TTC-mep, se realizaron ensayos de dot blot y western blot. El análisis dot blot se efectuó aplicando 6 μL de cada muestra sobre una

membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), fijándolas en puntos definidos. La membrana se bloqueó durante 24 horas a 4 °C con una solución de bloqueo compuesta por 5 % de leche descremada en polvo disuelta en PBS con 0.05 % (v/v) de Tween 20.

Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS + 0.05 % (v/v) de Tween 20 y se incubó la membrana durante 24 horas a 4 °C con un anticuerpo primario específico contra el fragmento C de la toxina del tétanos (anti-TTC, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA), a una dilución de 1:2000. Al finalizar, se repitieron los lavados y se incubó la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra contra conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), también a una dilución de 1:2000 (Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA). La detección se realizó mediante incubación con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Pierce, Rockford, IL, EUA).

Para la realización del ensayo western blot, las muestras proteicas se separaron en un gel de poliacrilamida bajo las mismas condiciones descritas para SDS-PAGE. Al finalizar la migración, en lugar de teñir el gel, se procedió a transferir las proteínas hacia una membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A partir de este punto, se siguió la misma metodología descrita para el dot blot.

6.7 Evaluación inmunológica

La evaluación inmunológica de la TTC-mep se llevó a cabo utilizando modelos murinos de la cepa BALB/c, hembras de siete semanas de edad. Se establecieron tres grupos experimentales (Tabla 1), cada uno conformado por cinco individuos. Dos de los grupos fueron inmunizados con 1 µg y 5 µg de la proteína recombinante, respectivamente, adyuvada con hidróxido de aluminio [Al(OH)₃] (G Biosciences, St. Louis, MO, EUA; cat. no. 786-1215) en una proporción 1:5. La mezcla fue ajustada a un volumen final de 200 µL utilizando como vehículo una solución amortiguadora de sacarosa al

10 % y Tween 20 al 0.01 %. Además, se incluyó un grupo control que no recibió la proteína recombinante.

Grupo	Formulación
1	1 µg Proteína. + Al (OH)3 + Vehículo
2	5 µg Proteína. + Al (OH)3 + Vehículo
3	Al (OH)3 + Vehículo

Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales. Los ratones fueron asignados aleatoriamente a los esquemas descritos.

El esquema de inmunización consistió en tres aplicaciones por vía subcutánea los días 0, 14 y 28, con toma de muestras sanguíneas para la obtención de suero los días 27, 42 y 56. Las muestras de sangre fueron recolectadas mediante punción en la cola; posteriormente, se permitió la formación del coágulo durante 15 minutos, seguido de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos para la obtención del suero. Los sueros fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis posterior.

Esta metodología se realizó siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Ética Institucional (CEID-2020-07R1).

6.8 Determinación de títulos de anticuerpos mediante ELISA

Se realizaron ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos generados contra la proteína S del SARS-CoV-2 en el suero de los ratones inmunizados con la TTC-mep. Para ello, se sensibilizó una placa de poliestireno de 96 pozos con 200 ng/pozo de la proteína S (subunidades S1 + S2) diluida en *buffer* de carbonatos (15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃, pH 9.6) y se incubó toda la noche a 4 °C. Al término de la incubación, la placa fue lavada con PBS 1× utilizando un lavador de microplacas Wellwash™ (Thermo Scientific™, Cat. No.

5165000). Posteriormente, se bloqueó con una solución de leche descremada al 5 % en PBS 1× durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se agregaron diluciones de los sueros sanguíneos en PBS 1× y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al finalizar, la placa se lavó nuevamente como en los pasos anteriores y se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra contra ratón, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:2000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la placa fue lavada por última vez y se añadió la solución de sustrato ABTS, compuesta por 0.6 mM de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La absorbancia se midió a 405 nm después de 60 minutos utilizando un lector de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Los títulos de anticuerpos se calcularon como el recíproco de la mayor dilución de suero cuyo valor medio de absorbancia (OD) superó el valor del grupo control más dos veces la desviación estándar.

7 Resultados

7.1 Evaluación de la expresión de la TTC-mep en *E. coli* por SDS-PAGE

Condiciones de expresión: 28 °C, 1 g/L lactosa, 16 h

La expresión de la TTC-mep se llevó a cabo en un sistema de matraz con *E. coli* en 100 mL de cultivo a 28 °C durante 16 h e inducido con lactosa a 1 g/L. Los extractos celulares se separaron por SDS-PAGE utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como referencia de peso molecular. Con base en la referencia de BSA, se buscó una banda a ~72 kDa correspondiente a la proteína recombinante. En las fracciones total, soluble e insoluble se observaron múltiples bandas propias del hospedero; sin embargo, no se detectó una banda definida en 72 kDa o, en su caso, la señal fue tenue y no distinguible del fondo, lo que indica un nivel de expresión muy bajo en estas condiciones (Figura 1).

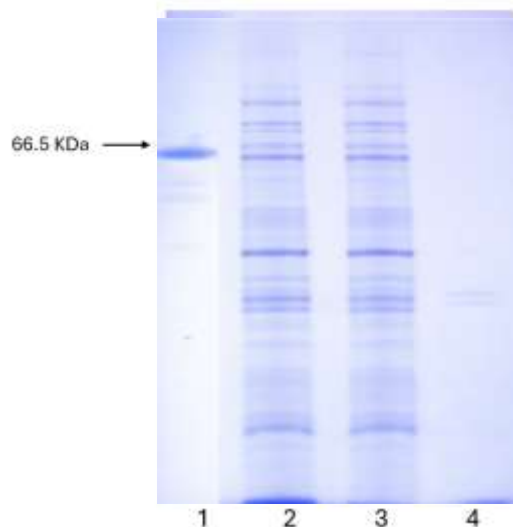


Figura 1. Análisis SDS-PAGE de los extractos de proteína recuperados tras la expresión en *E. coli* de la TTC-mep a 28°C por 16 horas. Carriles: 1, Albúmina de suero bovino (BSA) como referencia de peso molecular; 2, Fracción de proteína total; 3, Fracción de proteína soluble; 4, Fracción de proteína insoluble.

Condiciones de expresión: 15°C, 1 g/L lactosa, 2 h a 10 h

La expresión de la TTC-mep de forma soluble se evaluó a 15 °C mediante muestreo a las 2 y 7 h tras la inducción. El análisis por SDS-PAGE, mostró la presencia de una banda que concuerda con el peso molecular teórico de TTC-mep. En comparación con la condición previa a 28 °C, la expresión a 15 °C fue mayor, evidenciando una mejora en la calidad de la expresión a temperatura reducida. El control sin inducción no presentó una banda positiva, confirmando la dependencia de la expresión de la proteína ante el proceso de inducción. Estos datos indican que la disminución de la temperatura favoreció la acumulación de la proteína en el intervalo evaluado (Figura 2).

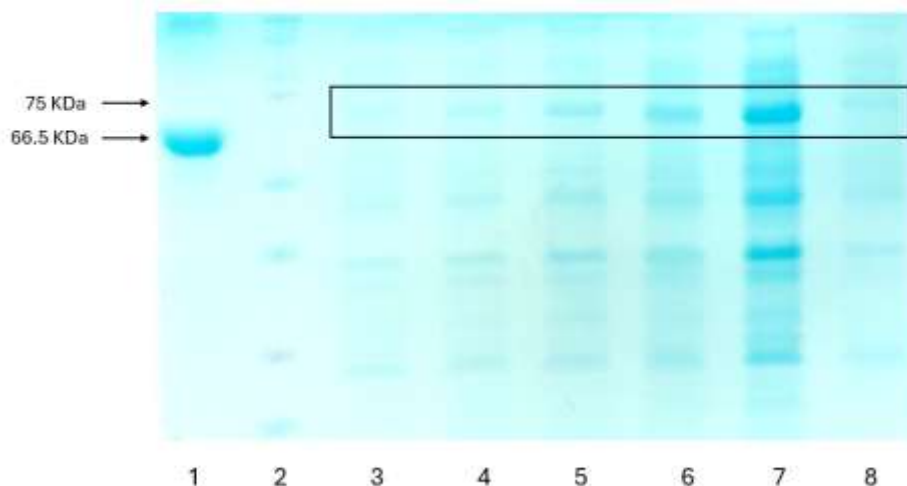


Figura 2. *Análisis SDS-PAGE de la cinética de expresión de la TTC-mep soluble a 15°C.* Carriles: 1, BSA; 2, Marcador de peso molecular; 3, Muestra a 2 horas; 4, Muestra a 4 horas; 5, Muestra a 6 horas; 6, Muestra a 8 horas; 7, Muestra a 10 horas; 8, Cultivos sin inducir.

7.2 Detección por dot blot y evidencia de expresión basal a 15°C, 1 g/L lactosa y 7 horas de inducción.

La presencia de la TTC-mep se evaluó mediante un análisis dot blot a partir de fracciones de proteína sin purificar. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-TTC y se incluyeron controles positivo y negativo. Bajo estas condiciones, se registró una señal intensa para la preparación con la TTC-mep, confirmando su antigenicidad. De forma adicional, se detectó una señal en el extracto de *E. coli* transformada sin inducción, lo que sugiere fuga de expresión en ausencia de inductor. Por el contrario, el extracto de *E. coli* sin transformar y el control negativo no mostraron reactividad, mientras que el control positivo presentó la intensidad esperada. Estos resultados confirman la presencia y antigenicidad de la proteína TTC-mep, aunque también confirman un nivel basal de su expresión en *E. coli* (Figura 3).

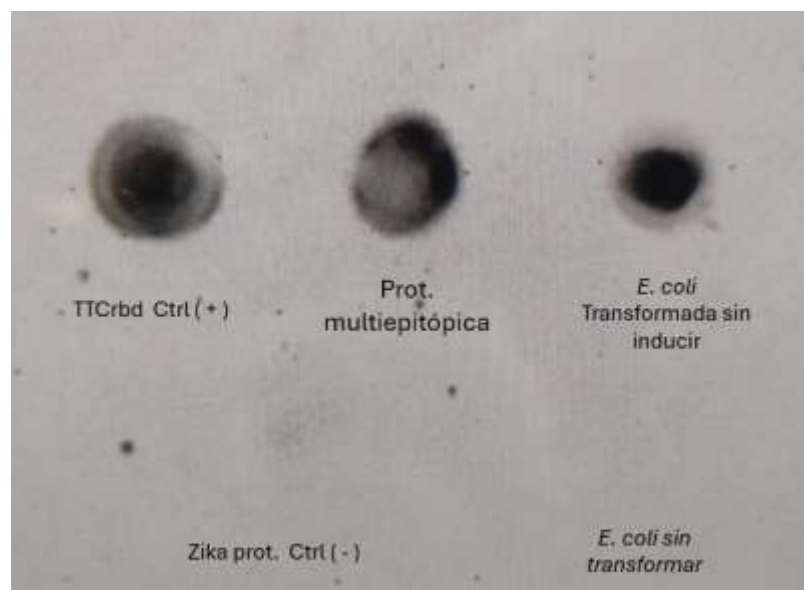


Figura 3. *Análisis Dot Blot de fracción de proteína soluble sin purificar. Se analizarlo muestras derivadas de cultivos de E. coli sin inducir, sin transformar y controles.*

La expresión de la TTC-mep en la fracción soluble se comparó bajo dos regímenes: 6 °C durante 6 días y 15 °C durante 10 h. Los extractos se analizaron por SDS-PAGE. A 6 °C por 6 días de expresión se observó una mayor expresión de TTC-mep respecto de la expresión a 15 °C por 10 h, lo que indica una mayor acumulación soluble con temperatura reducida y tiempo de inducción prolongado. En los controles (cultivo transformado sin inducir y cultivo sin transformar, ambos a 15 °C/10 h) no se detectaron señales relevantes. De esta manera se muestra que la disminución de la temperatura, acompañada de un mayor tiempo de expresión, favorece la acumulación de la proteína recombinante (Figura 4).

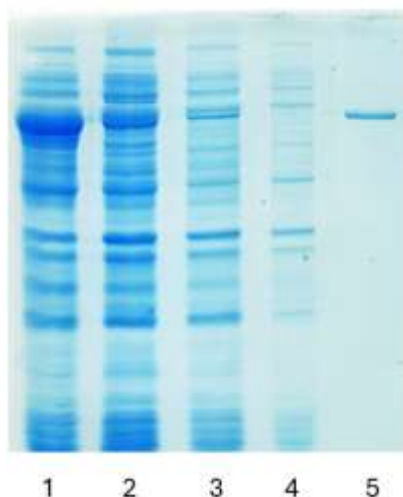


Figura 4. *Análisis SDS-PAGE de extractos solubles de la TTC-mep expresados bajo diferentes condiciones. Carriles: 1, Cultivo inducido a 6°C por 6 días; 2, Cultivo inducido a 15°C por 10 horas; 3, Cultivo sin inducir incubado a 15°C por 10 horas; 4, Cultivo sin transformar incubado a 15°C por 10 horas. 5, BSA*

7.3 Cinética de expresión soluble a 6 °C

La producción de la TTC-mep se monitoreó diariamente por un periodo de 6 días en cultivos inducidos y mantenidos a 6 °C. Los análisis por SDS-PAGE evidenciaron una expresión positiva de TTC-mep, observándose un aumento progresivo en su acumulación, sin cambios evidentes en los muestreos finales. El patrón de proteínas endógenas se mantuvo comparable entre días y no se apreciaron bandas adicionales en la zona de menor peso molecular que sugirieran proteólisis evidente. Con esto podemos observar que la incubación prolongada a 6 °C sostiene la acumulación de la proteína recombinante en forma soluble a lo largo del periodo evaluado (Figura 5).

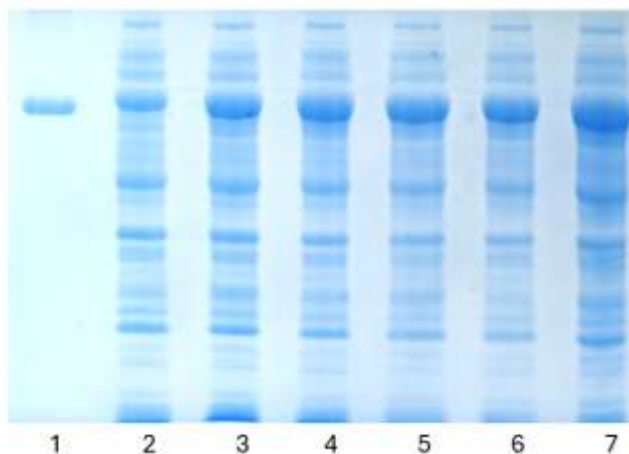


Figura 5. *Análisis SDS-PAGE de la cinética de expresión de la TTC-mep soluble 6°C.*
Carriles: 1, BSA; 2 - 7, Muestras día 1 a 6

7.4 Precipitación de la proteína soluble destinada a la purificación por IMAC

La fracción soluble de la TTC-mep se mantuvo inicialmente en solución hipotónica (agua filtrada) y posteriormente se realizó un intercambio de buffer previo a la cromatografía por IMAC. Tras el cambio de buffer, se observó la formación de un sedimento en el vial, el cual fue analizado por SDS-PAGE, lo que confirmó que corresponde a la TTC-mep precipitada, lo que condujo a un rendimiento muy bajo para la purificación mediante IMAC de la proteína remanente soluble, observándose señales tenues o no detectables en la SDS-PAGE de las fracciones obtenidas (Figura 6).

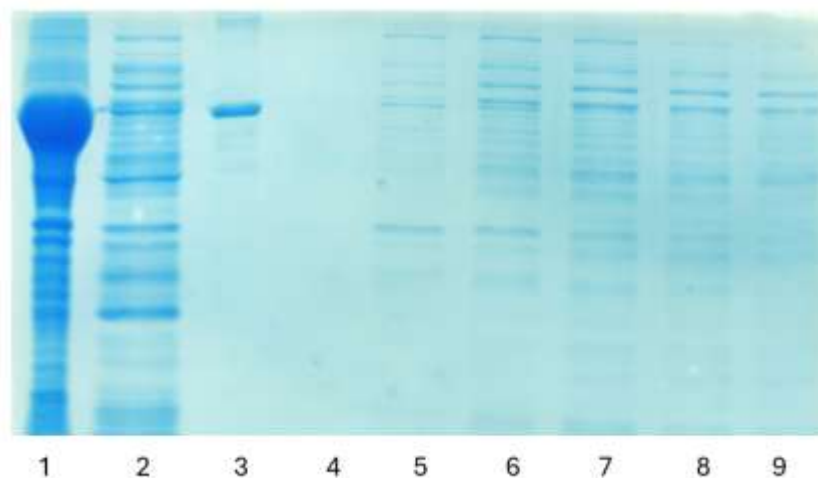


Figura 6. *Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras la purificación mediante IMAC. Carriles: 1, Proteína precipitada en el cambio de buffer; 2, Proteína inyectada a IMAC; 3, BSA; 4 - 5 fracciones adsorbidas.*

7.5 Evaluación de la fracción insoluble: cuerpos de inclusión

Ante la pérdida de proteína TTC-mep durante el intercambio de buffer, se decidió analizar los cuerpos de inclusión del cultivo inducido a 6 °C por 6 días y se sometieron a lavados secuenciales (S4–S6). Cada lavado se analizó por SDS-PAGE. En estos lavados se detectó una banda de ~72 kDa con intensidad apreciable. De igual manera se observó un fondo proteico bajo, lo que indica que una fracción de la TTC-mep se recuperó en estas etapas de limpieza. Esto sugiere la disgregación del contenido de los cuerpos de inclusión durante el proceso de lavado, manteniéndose la señal en los diferentes pasos evaluados (Figura 7).

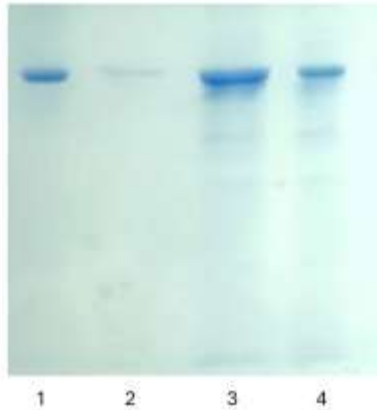


Figura 7. *Análisis SDS-PAGE de los lavados de cuerpos de inclusión del cultivo expresado a 6°C por 6 días. Carriles: 1, BSA; 2, Lavado S6; 3, Lavado S5; 4, Lavado S4.*

La fracción S5 obtenida del protocolo de lavados de cuerpos de inclusión se sometió a purificación por IMAC. En esta estrategia no se observó precipitado en el cambio de buffer destinado a la purificación, lo que nos sugiere una mayor estabilidad de la proteína de la fracción insoluble. Sin embargo, el análisis por SDS-PAGE, mostró una señal tenue de la proteína objetivo tanto en el material adsorbido como en las fracciones no adsorbidas. Esto sugiere que la cantidad recuperada tras la carga fue poca y que parte del material pudo permanecer en el flujo no retenido o diluirse durante los pasos cromatográficos. En conjunto, las fracciones obtenidas evidenciaron una recuperación escasa de la proteína a partir de S5 bajo estas condiciones (Figura 8).

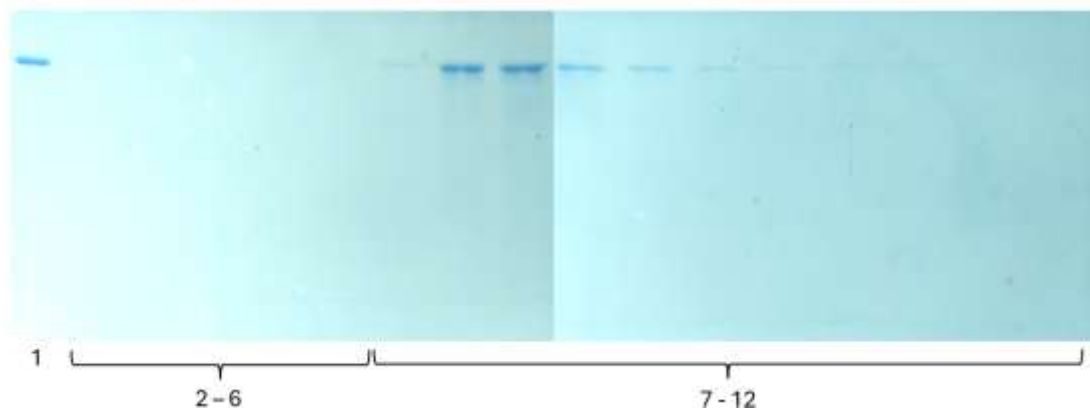


Figura 8. *Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras la purificación de la TTC-mep mediante IMAC. Carriles: 1, BSA; 2, Fracciones no adsorbidas a partir del lavado S5; 3, Fracciones de proteína adsorbida obtenidas del lavado S5.*

7.6 Enriquecimiento de la proteína recombinante en la fracción insoluble

Se modificaron las condiciones de cultivo para maximizar la acumulación de la TTC-mep en forma insoluble, con el objetivo de disponer de mayor cantidad de material para purificación y posterior replegamiento. La expresión se realizó a 28 °C durante 16 y 48 h, empleando dos concentraciones de inductor (1 y 15 g/L). Los extractos soluble e insoluble se analizaron por SDS-PAGE. Bajo estas condiciones, se apreció un incremento notorio de la banda compatible con la proteína recombinante en la fracción insoluble al aumentar tanto la concentración del inductor como el tiempo de cultivo, destacando la condición de 28 °C por 48 h con 15 g/L. En contraste, las fracciones solubles mostraron baja acumulación de TTC-mep, lo que indica que la combinación de mayor concentración de inductor y tiempo de expresión favorece la expresión de la proteína en cuerpos de inclusión (Figura 10).

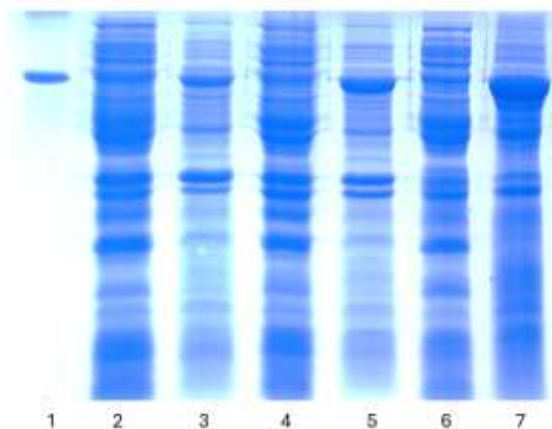


Figura 10. *Análisis SDS-PAGE de extractos de la TTC-mep soluble e insoluble expresada a 28°C por 16 y 48 horas a diferentes concentraciones de inductor. Carriles: 1, BSA; 2, Facción insoluble expresada a con 1 g/L de inductor por 16 horas; 3, Facción soluble expresada a con 1 g/L de inductor por 16 horas; 4, Facción soluble expresada a con 15 g/L de inductor por 16 horas; 5, Facción insoluble expresada a con 15 g/L de inductor por 16 horas; 6, Facción soluble expresada a con 1 g/L de inductor y 48 horas; 7, Facción insoluble expresada a con 15 g/L de inductor por 48 horas.*

A partir de cultivos bajo las condiciones que conducen a una mayor acumulación de TTC-mep (28 °C, 48 h, 15 g/L de inductor), se aislaron cuerpos de inclusión y se realizaron lavados secuenciales (S4–S6). Los sobrenadantes de cada etapa se analizaron por SDS-PAGE. En los lavados se detectó TTC-mep, con mayor intensidad en las fracciones S4 y S5 y menor en la fracción S6. (Figura 11).



Figura 11. *Análisis SDS-PAGE de los lavados de cuerpos de inclusión del cultivo expresado a 28°C por 48 horas. Carriles: 1, BSA; 2, Lavado S4; 3, Lavado S5; 4, Lavado S6.*

La fracción S5 obtenida de los cuerpos de inclusión del cultivo a 28 °C por 48 h (15 g/L de inductor) se sometió a cromatografía por IMAC. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE. En las fracciones no adsorbidas se detectaron señales débiles en ~72 kDa, indicando que una porción de TTC-mep no fue adsorbida por la columna. Por otro lado, la TTC-mep adsorbida fue recuperada en distintas fracciones durante la etapa de elución, con variaciones moderadas de intensidad entre ellas. (Figura 12).

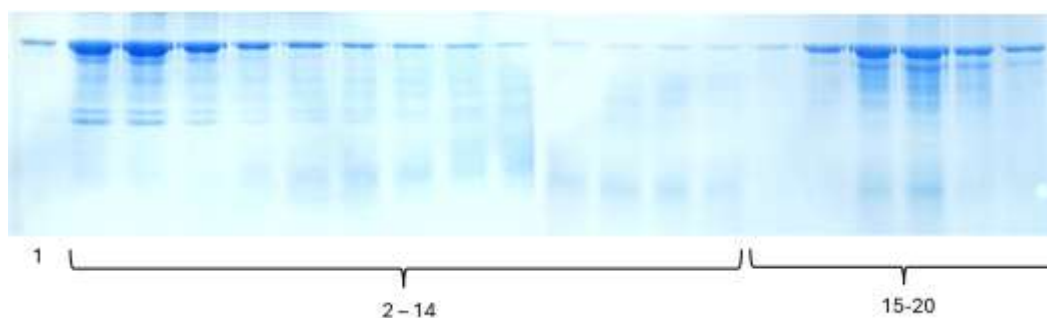


Figura 12. *Análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras la purificación de la TTC-mep mediante IMAC. Carriles: 1, BSA; 2-14, Fracciones no adsorbidas a partir del lavado S5; 15-20, Fracciones de proteína adsorbida obtenidas del lavado S5.*

7.7 Selección de fracciones para replegamiento y cuantificación por densitometría

De la purificación por IMAC se seleccionaron las fracciones más puras para someterlas al replegamiento. La concentración de la TTC-mep replegada se estimó por densitometría, construyendo una curva estándar con BSA (25–250 µg/mL) y comparando la intensidad de las bandas de las muestras replegadas (M2, M4, M5 y M6). En todas

las preparaciones se observó una banda predominante del peso molecular esperado (~72 kDa), lo que permitió determinar sus concentraciones por interpolación en la curva estándar. Estos resultados validan el nivel de pureza y los rendimientos que permitieron proceder con la evaluación de la inmunogenicidad de TTC-mep (Figura 13).

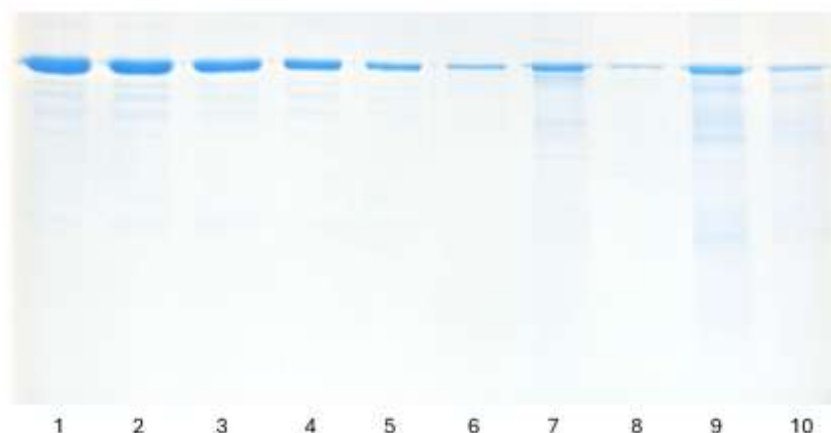


Figura 13. *Densitometría para determinar la concentración de la TTC-mep replegada.* Carriles: 1 - 5, curva estándar de BSA (250, 200, 150, 100, 50, 25 µg/mL, respectivamente). 7 – 10, muestras M2, M4, M5 y M6 (Respectivamente) recuperadas tras la purificación y replegamiento de la proteína.

7.8 Respuesta humoral específica por ELISA

La inmunogenicidad de la TTC-mep se evaluó en términos de la inducción de respuestas humorales sistémicas determinadas mediante ELISA indirecto utilizando la propia proteína TTC-mep como antígeno de captura. Se analizaron sueros obtenidos el día 56 del esquema de vacunación en diluciones 1:5 000, 1:10 000, 1:15 000 y 1:20 000, comparando grupos control y aquellos que recibieron dos niveles de dosis de antígeno (1 µg y 5 µg). Las lecturas de absorbancia mostraron reactividad específica en los grupos inmunizados, cuya magnitud correlacionó con la dosis, es decir el grupo inmunizado con 5 µg de TTC-mep presentó valores superiores respecto a los que recibieron

1 µg en la mayoría de las diluciones evaluadas. En contraste, el control permaneció cercano a los niveles basales a lo largo del rango de dilución. La señal se mantuvo detectable en los grupos vacunados hasta 1:20 000, indicando la presencia de IgG específicas sostenidas al final del protocolo (Figura 14).

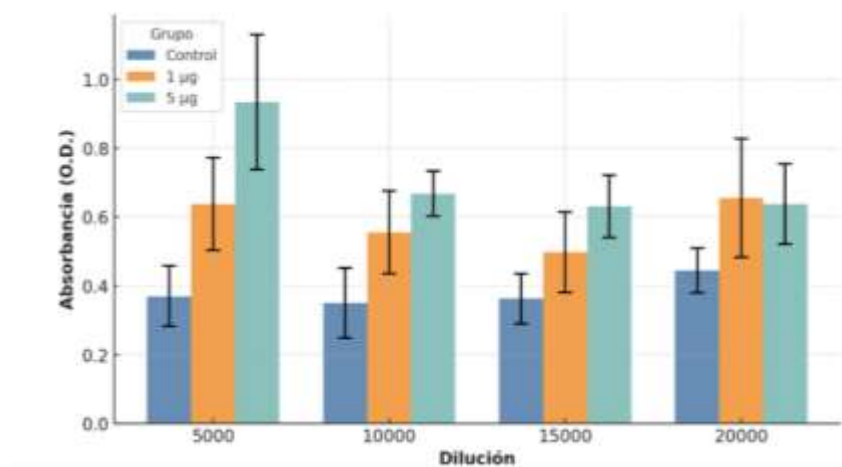


Figura 14. *Títulos de anticuerpos IgG séricos inducidos por TTC-mep.* La respuesta humoral inducida en ratones por TTC-mep fue evaluada mediante ELISA empleando dicha proteína como antígeno diana. Se emplearon muestras de suero obtenidas el día 56 del esquema de vacunación y en diluciones de 1:5,000, 1:10,000, 1:15,000 y 1:20,000 empleando un anti-IgG de cabra contra ratón como anticuerpo secundario en dilución 1:2000.

7.9 Inmunización con TTC-mep de referencia

Se inmunizaron ratones ($n = 4$) con la TTC-mep de referencia adquirida de GenScript en un esquema de tres dosis semanales de 5 µg cada una, y los sueros se analizaron al día 21 por ELISA indirecto. Para la detección se emplearon tres antígenos de captura: la propia proteína de referencia, la TTC-mep expresada y purificada de *E. coli* y

la proteína S. Las lecturas mostraron reactividad específica frente a la proteína de referencia y, en magnitud comparable o superior, frente a la proteína recombinante purificada, evidenciando reconocimiento de epítopes compartidos entre ambas proteínas. En el control de S se observaron valores cercanos al basal, mientras que el grupo control sin inmunizar permaneció en niveles mínimos, obtenido al día 21 generación de IgG específicas contra la TTC-mep de referencia con capacidad de reconocer a la producida en *E. coli* (Figura 15).

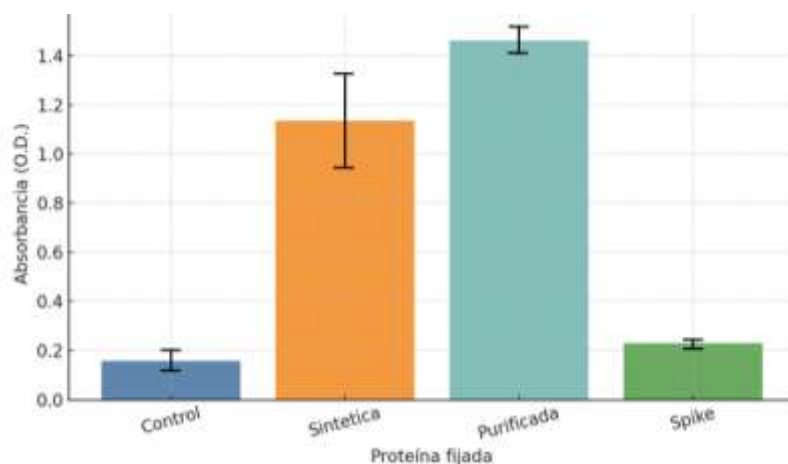


Figura 15. *Títulos de anticuerpos IgGs en sueros de ratones (Dilución 1:100) inmunizados con la TTC-mep de referencia obtenidos el día 21 del esquema de inmunización. Se utilizaron diferentes proteínas diana: TTC-mep de referencia, TTC-mep expresada y purificada y proteína S, así como un anti-IgG de cabra contra ratón como anticuerpo secundario en dilución 1:2000.*

Se evaluó la reactividad de los sueros de los ratones inmunizados con la TTC-mep de referencia o con la TTC-mep expresada y purificada de *E. coli* hacia la proteína S mediante ELISA indirecto. En ambos esquemas de inmunización se registraron señales de absorbancia bajas, ligeramente superiores al grupo control, y sin diferencias marcadas entre los dos grupos inmunizados. Se observó una baja variabilidad en las

lecturas y el resultado general indica una reactividad limitada frente a S en estas condiciones (Figura 16).

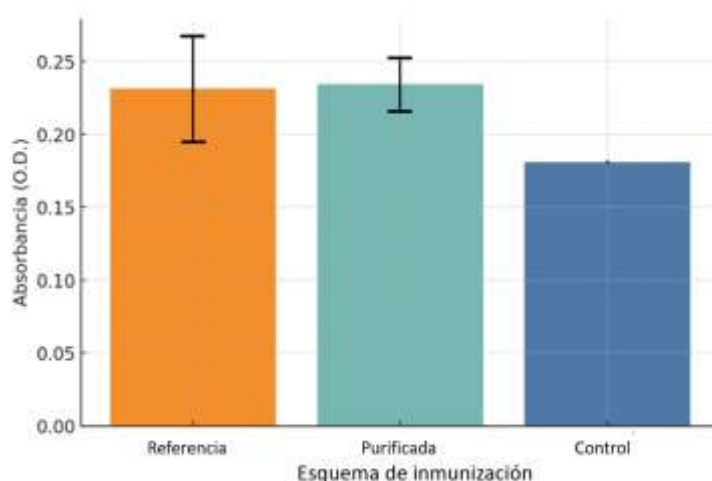


Figura 16. *Títulos de anticuerpos IgGs anti-S en sueros de ratones del día 21 del esquema de inmunización con la TTC-mep de referencia, con la TTC-mep expresada y purificada en dilución 1:100 utilizando un anti-IgG de cabra contra ratón como anticuerpo secundario en dilución 1:2000*

8 Discusión

En este estudio se evaluó la proteína TTC-mep, diseñada como candidato vacunal y producida en *Escherichia coli*, con el propósito de desarrollar nuevos prototipos de vacunas frente a SARS-Cov-2. La estrategia experimental incluyó la inducción de la expresión a diferentes temperaturas, el análisis de solubilidad, la purificación mediante IMAC, el posterior replegamiento de la proteína, así como la evaluación de su capacidad inmunogénica en un modelo murino. Este enfoque experimental se alinea con estudios en los que se han empleado plataformas recombinantes microbianas como *E. coli*, las cuales ofrecen alta productividad, bajo costo y capacidad de escalabilidad

(Ghaderi et al., 2024). Sin embargo, como se ha observado en estudios previos, esta plataforma enfrenta retos inherentes al plegamiento adecuado de las proteínas recombinantes y la correcta presentación de los epítopes para inducir una respuesta inmune eficaz. Estos desafíos surgen principalmente cuando se emplean promotores fuertes y se alcanzan altos niveles de expresión, lo que puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión afectando la solubilidad y la funcionalidad de la proteína dado que el replegamiento *in vitro* en ocasiones no garantiza un despliegue adecuado de los epítopes (Baneyx & Mujacic, 2004) (Studier, 2005).

El grupo de investigación en el que se realizó este trabajo se han diseñado y evaluado proteínas antigénicas como LTB-RBD y LTP50, las cuales fueron producidas en *E. coli*, encontrándose que éstas se expresan en forma insoluble. En estos casos, fue necesario realizar etapas de solubilización utilizando urea 8 M para disolver los cuerpos de inclusión, seguidas de una purificación mediante cromatografía de afinidad IMAC y la posterior aplicación de técnicas de diálisis controlada para restablecer la estructura nativa de las proteínas. Aunque estos métodos han demostrado ser efectivos, es crucial optimizar cuidadosamente las condiciones del proceso para garantizar tanto la recuperación como la funcionalidad del antígeno (Solís-Andrade et al., 2022) (Wong-Arce et al., 2024).

Los resultados de expresión observados en condiciones a temperaturas bajas son congruentes con la mejora de solubilidad por disminución de la velocidad de traducción y mayor oportunidad para el plegamiento co-traducciona, lo que reduce la formación de cuerpos de inclusión. Aun así, si se genera una sobreexpresión de proteínas es frecuente que una proporción importante del producto se agregue en la fracción insoluble por falta de chaperonas y estrés celular (Baneyx & Mujacic, 2004). Hablando específicamente del proceso, el protocolo que comprende el lavado de cuerpos de inclusión y su solubilización seguida de purificación por IMAC y su replegamiento por diálisis se ha consolidado como ruta robusta para la producción de antígenos complejos en *E. coli*, como se mostró en la expresión tanto de LTB-RBD como de LTP50,

donde se obtuvieron purezas mayores al 90 % y cantidades suficientes para la formulación de prototipos de vacunas (Solís-Andrade et al., 2022) (Wong-Arce et al., 2024)

Un paso crítico en la estandarización de la producción de TTC-mep fue el intercambio de buffer previo a la cromatografía. Cambios abruptos en la fuerza iónica y pH en el medio favorecen la generación de agregados y precipitación del antígeno, disminuyendo el material disponible para adsorción en IMAC (Jiang, Zhang, & Wang, 2025). Esto es esperable en proteínas quiméricas con dominios flexibles, donde en estados parcialmente plegados pueden ocultar la etiqueta His y disminuir la solubilidad. En estos casos la purificación en condiciones desnaturalizantes (6–8 M urea) con un proceso de replegamiento posterior puede reducir pérdidas tempranas de proteína (Wong-Arce et al., 2024).

La detección de una señal basal de expresión en los cultivos no inducidos mediante el análisis *dot blot* indica que el sistema de expresión no está completamente reprimido. Esto concuerda con lo que se conoce como “leaky expression” del sistema T7 bajo control del operón *lac*, fenómeno que ocurre debido a que el promotor T7 puede presentar actividad residual y permitir una baja actividad de la ARN polimerasa, dando lugar a una expresión basal, que, aunque baja, tiene consecuencias importantes: por un lado, aumenta el nivel de fondo en los ensayos de detección, y por otro, puede afectar la calidad estructural de la proteína. Esto último sucede porque la traducción prematura durante las fases de crecimiento celular, cuando el ambiente aún no es óptimo para el plegamiento correcto, puede favorecer la formación de agregados o proteínas parcialmente plegadas, reduciendo el rendimiento de proteína funcional tras la inducción (Dubendorff & Studier, 1991).

En términos inmunológicos, se observó una clara reactividad frente al antígeno recombinante, mientras que la respuesta contra la proteína S nativa fue mucho más débil. Existen dos posibles explicaciones para este comportamiento, que no se excluyen mutuamente. La primera es que los epítopes B conformacionales, especialmente en las regiones RBD/S1, podrían haber tenido un plegamiento o conformación

subóptimos después de la etapa de refolding, lo que afectaría su capacidad para inducir una respuesta inmune fuerte. La segunda hipótesis tiene que ver con la arquitectura de los *linkers* o conectores utilizados, los cuales podrían no estar favoreciendo una adecuada exposición de los epítopes, ni permitiendo su procesamiento eficiente por el sistema inmunológico a través del MHC II.

Para la proteína LTP50, se utilizaron *linkers* de rigidez variable de tipo GPGP en posiciones clave, en comparación con segmentos flexibles de GGGGS entre epítopes. Estas diferencias en la rigidez de los *linkers* tienen un impacto directo en la accesibilidad y la orientación de los epítopes antigénicos, lo que podría explicar las variaciones en la respuesta inmune observada (Solís-Andrade et al., 2022). De manera más amplia, se ha recomendado el uso de secuencias como GPGP para epítopes de células T helper (HTL) y células B, AAY para células T citotóxicas (CTL), y EAAAK para separar dominios grandes o adyuvantes proteicos. Estas secuencias ayudan a modular la distancia y la rigidez entre los epítopes, favoreciendo así la interacción con células T y la maduración de las células B. En los diseños de vacunas multiepitópicas, es común observar títulos de anticuerpos sin capacidad de neutralización, lo cual ocurre debido a que las topologías de los epítopes no reproducen correctamente los sitios funcionales de bloqueo. Esto resalta la importancia de ajustar el tipo y la longitud de los *linkers* y de reordenar los epítopes de acuerdo con su proximidad en la estructura nativa del antígeno, lo cual son pasos clave para mejorar la efectividad de la respuesta inmune (He et al., 2020) (Khamjan et al., 2023)

El uso del fragmento C de la toxina tetánica (TTC) como acarreador en vacunas basadas en proteínas ha sido ampliamente documentado debido a su capacidad para inducir respuestas inmunológicas robustas. Este dominio, al contener múltiples epítopes reconocidos por linfocitos T CD4+, facilita la activación de células T auxiliares, lo que potencia la respuesta de células B y la producción de anticuerpos específicos. Estudios como los de Bayart y col. (2022) han destacado que el TTC, al incluir 13 de los 28 epítopes reconocidos por más del 75% de los pacientes, puede ser considerado una de las partes inmunodominantes de la toxina tetánica. Además, investigaciones

previas han demostrado que la fusión de epítopes de interés con TTC mejora la inmunogenicidad de antígenos dirigidos a células T CD8+, como los antígenos oncogénicos E6 y E7 del virus del papiloma humano, al inducir una respuesta robusta de células T CD8+ y mejorar la estabilidad del antígeno fusionado (Bayart, 2022).

Sin embargo, en este trabajo, a pesar de utilizar TTC como parte de la proteína recombinante, no se observó una respuesta inmune significativa frente a la proteína S en los modelos murinos. Esto puede sugerir que factores como el tipo de linker, la conformación del antígeno o la exposición de los epítopes requieren de una posterior optimización. A pesar de estos desafíos, el empleo de TTC como acarreador proporciona valiosas lecciones sobre la optimización de la presentación antigénica. Los hallazgos obtenidos aportan al uso de esta plataforma para futuras investigaciones y aplicaciones. La experiencia adquirida en la producción y purificación de proteínas multipitópicas en *E. coli* basadas en TTC como acarreador será fundamental para el desarrollo de nuevas vacunas, dirigidas por ejemplo a Zika y CHIKV, donde se podrán hacer ajustes en los protocolos de solubilización, replegamiento y adyuvantes con el fin de mejorar la inmunogenicidad y la efectividad frente a estos patógenos emergentes.

Desde un punto de vista práctico, la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, incluso cuando estas proteínas se acumulan en una forma insoluble, no es la opción ideal cuando se tiene la necesidad de una producción rápida. Sin embargo, en un contexto industrial, *E. coli* resulta ser una opción atractiva debido a sus altas tasas de producción a tiempos cortos, la facilidad de purificación y la reducción de proteólisis. La principal desventaja es que, al producirse la proteína en una forma insoluble, se requiere de procesos adicionales como el replegamiento para recuperar la proteína funcional. Una vez que este proceso de replegamiento es optimizado y estandarizado, se vuelve reproducible, lo que facilita su implementación a gran escala (De Marco et al., 2019). Además, esta tecnología no solo es útil para la producción de una proteína recombinante específica, sino que también se puede aplicar a otros patógenos, como Zika o CHIKV, los cuales son actualmente un objetivo central en el grupo de

investigación. La ventaja de este enfoque es que, al ser un sistema modular, se pueden ajustar fácilmente los epítopes y los *linkers*, y el conocimiento sobre cómo solubilizar y replegar proteínas se puede transferir rápidamente a nuevos proyectos, acelerando así la evaluación preclínica de vacunas.

9 Conclusiones

1. La construcción y producción en *E. coli* de la proteína recombinante TTC-mep fue viable, confirmado la factibilidad del diseño basada en el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) como acarreador antigénico.
2. El proceso de expresión, purificación y replegamiento permitió obtener proteína recuperable y purificada, demostrando su aplicabilidad a variantes o grupos de epítopes similares.
3. Los rendimientos y la estabilidad del antígeno fueron adecuados para su caracterización básica; sin embargo, mostraron pérdidas durante algunos cambios de buffer y señales de agregación, lo que indica la necesidad de optimizar las condiciones de fuerza iónica y el proceso cromatográfico.
4. En el modelo murino, el antígeno indujo la producción de IgGs específicas, aunque la magnitud de la respuesta humoral fue menor a la esperada y no mostró la potencia deseada frente a la proteína S completa, sugiriendo que es necesario mejorar la presentación de epítopes y/o la formulación. En el contexto de las vacunas virales, la inducción de una respuesta humoral dirigida contra proteínas del patógeno es un componente clave para el establecimiento de una respuesta inmune robusta y protectora.
5. A pesar de las limitaciones, el estudio valida la factibilidad de la plataforma de producción de antígenos multiepitópicos con TTC, proporcionando una base metodológica clara que permite optimizaciones rápidas en rendimiento, solubilidad y respuesta

inmunológica. Estos hallazgos aportan conocimiento relevante para la producción de vacunas basadas en proteínas que utilizan acarreadores proteicos como estrategia de diseño.

6. El diseño y el proceso establecidos constituyen un punto de partida sólido para la realización de evaluaciones preclínicas que fortalezcan el desarrollo de vacunas recombinantes de nueva generación.

10 Bibliografía

Abebe, E. C., & Asmamaw, D. T. (2023). Protective roles and protective mechanisms of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 infection and their potential clinical implications. *Frontiers in Immunology*, 14, 1055457. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1055457>

Arandia-Guzmán, J., & Antezana-Llaveta, G. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(2), 170–178. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009

Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2), 166725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>

Asociación Española de Pediatría. (2025). Manual de vacunas de la Asociación Española de Pediatría: Capítulo 48. <https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-48>

Avci, F. Y., & Kasper, D. L. (2019). Glycoconjugates: What it would take to master these well-defined antigens. *mSphere*, 4(6), e00520-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00520-19>

- Awate, S., Babiuk, L. A., & Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4, 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Barouch, D. H. (2022). Covid-19 vaccines — Immunity, variants, boosters. *The New England Journal of Medicine*, 387(11), 1011–1020. <https://doi.org/10.1056/NEJMr2206573>
- Bayart, C., Mularoni, A., Hemmani, N., Kerachni, S., Jose, J., Gouet, P., Paladino, J., & Le Borgne, M. (2022). Tetanus toxin fragment C: Structure, drug discovery research and production. *Pharmaceuticals*, 15(6), 756. <https://doi.org/10.3390/ph15060756>
- Bravo, L., Smolenov, I., Han, H. H., Li, P., Hosain, R., Rockhold, F., Clemens, S. A. C., Roa, C., Jr, Borja-Tabora, C., Quinsaat, A., Lopez, P., López-Medina, E., Brochado, L., Hernández, E. A., Reynales, H., Medina, T., Velasquez, H., Toloza, L. B., Rodriguez, E. J., ... Clemens, R. (2022). Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: A phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 399(10323), 461-472. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00055-1)
- Buiga, A. A. M., Molina, E. M. E., & Martín, G. F. (2022). *Una revolución que no cesa*. Enfermería Docente. Recuperado de <https://www.huvv.es/sites/default/files/revistas/115-06-ES-Una%20revluci%C3%B3n%20que%20no%20cesa.pdf>
- Carpp, L. N., Hyrien, O., Fong, Y., Benkeser, D., Roels, S., Stieh, D. J., Van Dromme, I., Van Roey, G. A., Kenny, A., Huang, Y., Carone, M., McDermott, A. B., Houchens, C.
- Carpp, L. N., Hyrien, O., Fong, Y., Benkeser, D., Roels, S., Stieh, D. J., Van Dromme, I., Van Roey, G. A., Kenny, A., Huang, Y., Carone, M., McDermott, A. B., Houchens, C. R., Martins, K., Jayashankar, L., Castellino, F., Amoa-Awua, O., Basappa, M., Flach, B., ... the United States Government (USG)/CoVPN Biostatistics Team. (2024). Neutralizing antibody correlate of protection against severe-critical COVID-19 in the

ENSEMBLE single-dose Ad26.COVS vaccine efficacy trial. *Nature Communications*, 15(1), 9785. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53727-y>

Centers for Disease Control and Prevention. (2022). Understanding protein subunit COVID-19 vaccines. U.S. Department of Health & Human Services. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/119538>

Centers for Disease Control and Prevention. (2023). COVID-19 vaccine basics. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.cdc.gov/covid/vaccines/how-they-work.html>

Chai, P., Pu, X., Ge, J., Ren, S., Xia, X., Luo, A., Wang, S., Wang, X., y Li, J. (2021). The recombinant protein combined vaccine based on the fragment C of tetanus toxin and the cross-reacting material 197. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(4), 1683-1692.

Chang, M.-J., Ollivault-Shiflett, M., Schuman, R., Nguyen, S. N., Kaltashov, I. A., Bobst, C., Rajagopal, S. P., Przedpelski, A., Barbieri, J. T., & Lees, A. (2022). Genetically detoxified tetanus toxin as a vaccine and conjugate carrier protein. *Vaccine*, 40(35), 5103–5113. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.011>

Chen, Z., & Wherry, E. J. (2020). T cell responses in patients with COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 529–536. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>

Comisión Europea. (2020). *Preguntas y respuestas: Autorización condicional de comercialización de las vacunas contra la COVID-19 en la UE*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/qanda_20_2390

Coutiño Rodríguez, E. M. del R. (2023). Innate immune system and SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *Allergy Mexico Magazine*, 70(3), 129–145. <https://doi.org/10.29262/ram.v70i3.1200>

- Dai, L., Gao, L., Tao, L., Hadinegoro, S. R., Erkin, M., Ying, Z., He, P., & ZF2001 Global Trial Group. (2022). Efficacy and safety of the RBD-dimer-based COVID-19 vaccine ZF2001 in adults. *The New England Journal of Medicine*, 386(22), 2097–2111. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202261>
- De Marco, A., Ferrer-Miralles, N., García-Fruitós, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U., Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(1), 53-72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>
- Dubendorff, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 45–59. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2)
- EMA. (2021). Guideline on clinical evaluation of vaccines. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/clinical-evaluation-new-vaccines-scientific-guideline>
- Fliesler, N. (2021). *Emerging protein-based COVID-19 vaccines could be game-changing*. Boston Children's Hospital. <https://answers.childrenshospital.org/protein-based-covid-19-vaccines/>
- Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., & Langlois, M.-A. (2020). Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. *Frontiers in Immunology*, 11, 610688. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.610688>
- Garçon, N., Vaughn, D. W., & Didierlaurent, A. M. (2012). Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Review of Vaccines*, 11(3), 349–366. <https://doi.org/10.1586/erv.11.192>
- Ghaderi, H., Shoari, A., Salehi, S., Hassanzadeh Eskafi, A., Habibi-Anbouhi, M., Moazzami, R., & Behdani, M. (2024). Expression and purification of SARS-CoV-2 receptor binding domain in *Escherichia coli* for diagnostic and therapeutic purposes. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 19(5), 500-508. https://doi.org/10.4103/RPS.RPS_93_23

- He, J., Huang, J., Zhang, Y., Zhang, Y., & Lin, X. (2020). Vaccine design based on 16 epitopes of SARS-CoV-2 spike protein. *Clinical and Translational Science*, 13(6), 1097–1106. <https://doi.org/10.1002/jmv.26596>
- Heath, P. T., Galiza, E. P., Baxter, D. N., Boffito, M., Browne, D., Burns, F., ... & Madhi, S. A. (2021). Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 385(13), 1172–1183. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
- Heidary, M., Kaviar, V. H., Shirani, M., Ghanavati, R., Motahar, M., Sholeh, M., Ghahramanpour, H., & Khoshnood, S. (2022). A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Frontiers in Microbiology*, 13, 927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
- Hou, H., Zhang, B., Huang, H., Luo, Y., Wu, S., Tang, G., Liu, W., Mao, L., Mao, L., Wang, F., & Sun, Z. (2020). Using IL-2R/lymphocytes for predicting the clinical progression of patients with COVID-19. *Clinical and Experimental Immunology*, 201(1), 76–84. <https://doi.org/10.1111/cei.13450>
- Jegerlehner, A., et al. (2010). Carrier induced epitopic suppression of antibody responses to peptide–virus-like particle conjugates: Implications for vaccine design. *Vaccine*, 28(12), 2592–2601. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.029>
- Jeon, J. H., Kim, S., Kim, S. Y., Shin, K. S., Park, B., Chang, S., Kang, C. Y., Kim, Y. J., Park, J. E., Youk, S., Kim, D., & Yeo, J. (2025). Heterologous prime-boost vaccination drives stromal activation and adaptive immunity against SARS-CoV-2 variants. *Frontiers in Immunology*, 16, 1597417. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1597417>
- Jiang, X., Zhang, L., & Wang, Y. (2025). *Optimization of immobilized metal affinity chromatography for efficient purification of His-tagged proteins from CHO cells*. *Journal of Chromatography A*, 1775, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100230>
- Kalinke, U., Barouch, D. H., Rizzi, R., Lagkadinou, E., Türeci, Ö., Pather, S., & Neels, P. (2022). Clinical development and approval of COVID-19 vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 21(5), 609-619. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2042257>

- Khamjan, N. A., Mehta, P., & Prajapati, V. K. (2023). Immunoinformatics strategy to develop a novel universal multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2 nucleocapsid. *Infection, Genetics and Evolution*, 110, 105399. <https://doi.org/10.3390/vaccines11061090>
- Khoury, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., ... Davenport, M. P. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature Medicine*, 27(7), 1205–1211. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>
- Ko, E.-J., & Kang, S.-M. (2018). Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(12), 3041–3045. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
- Kudlay, D., Svistunov, A., & Satyshev, O. (2022). COVID-19 vaccines: An updated overview of different platforms. *Bioengineering (Basel)*, 9(11), 714. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110714>
- Lara-Rivera, A. L., Parra-Bracamonte, G. M., & López-Villalobos, N. (2021). Tasas de letalidad y factores de riesgo por COVID-19 en México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 47(4), 1–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662021000400009&lng=es&tlng=pt
- Liu, X., Chen, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, Z., & Xu, Q. (2024). Self-assembled epitope-based nanoparticles targeting the SARS-CoV-2 spike protein induce robust immune responses. *Nature Communications*, 15, 10214. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-10214-y>
- Lumley, S. F., O'Donnell, D., Stoesser, N. E., Matthews, P. C., Howarth, A., Hatch, S. B., Marsden, B. D., Cox, S., James, T., Warren, F., Peck, L. J., Ritter, T. G., de Toledo, Z., Warren, L., Axten, D., Cornall, R. J., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Screaton, G., ... Eyre, D. W. (2021). Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. *The New England Journal of Medicine*, 384(6), 533–540. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034545>

- Mayo Clinic. (2022). History of COVID-19: Outbreaks and vaccine timeline. Mayo Foundation for Medical Education and Research. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/history-disease-outbreaks-vaccine-timeline/covid-19>
- McGonagle, D., O'Donnell, J. S., Sharif, K., Emery, P., & Bridgewood, C. (2020). Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *The Lancet Rheumatology*, 2(7), e437–e445. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30121-1](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30121-1)
- Mekonnen, D., Kassa, T., & Tadesse, M. (2021). SARS-CoV-2 subunit vaccine adjuvants and their signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 12, 756. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.00756>
- Moss, P. (2022). The T-cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, 23(2), 186–193. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w> Nature
- Munoz-Fontela, C., Dowling, W. E., Funnell, S. G. P., Gsell, P. S., Riveros-Balta, A. X., Albrecht, R. A., ... & Baric, R. S. (2020). Animal models for COVID-19. *Nature*, 586(7830), 509–515. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>
- O'Hagan, D. T., & Fox, C. B. (2015). New generation adjuvants — From empiricism to rational design. *Vaccine*, 33(Suppl 2), B14–B20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.088>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Muertes en exceso a nivel mundial asociadas con la pandemia de COVID-19*. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/global-excess-deaths-associated-with-the-COVID-19-pandemic>
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). Fases de desarrollo de una vacuna. <https://www.paho.org/sites/default/files/2020-05/2020-cde-covid-19-fases-desarrollo-vacuna.pdf>
- Our World in Data. (2024). Cumulative COVID-19 vaccinations. University of Oxford. <https://ourworldindata.org/grapher/cumulative-covid-vaccinations>

- Our World in Data. (2025). *Cumulative confirmed COVID-19 deaths by world region*. <https://ourworldindata.org/grapher/cumulative-covid-deaths-region>
- Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO). (2024). Frequently asked questions: COVID-19 vaccines. <https://www.paho.org/en/covid-19-vaccines/frequently-asked-questions-covid-19-vaccines>
- Pastrian-Soto, G. (2020). Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2): Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *International Journal of Odontostomatology*, 14(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>
- Pastrian-Soto, G. (2020). Presencia y expresión del receptor ACE2 (target de SARS-CoV-2) en tejidos humanos y cavidad oral: Posibles rutas de infección en órganos orales. *International Journal of Odontostomatology*, 14(4), 501–507. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000400501>
- Pfizer España. (2020). Tipos de vacunas: ¿qué tecnología se emplea para cada una? <https://www.pfizer.es/salud/enfermedades-y-patologías/covid-19/tipos-de-vacunas-qu%C3%A9-tecnolog%C3%ADa-se-emplea-para-cada-una>
- Pichichero, M. E. (2013). Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development, and clinical trials. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(12), 2505–2523. <https://doi.org/10.4161/hv.26109>
- Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., Offit, P. A., & Edwards, K. M. (2024). *Plotkin's vaccines* (8th ed.). Elsevier.
- Pulendran, B., Arunachalam, P. S., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454–475. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
- Rafi, M. O., Al-Khafaji, K., Sarker, M. T., Taskin-Tok, T., Rana, A. S., & Rahman, M. S. (2022). Design of a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: immunoinformatic and

computational methods. RSC Advances, 12(7), 4288–4310.
<https://doi.org/10.1039/d1ra06532g>

Reed, S. G., Orr, M. T., & Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19(12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>

Salguero, F. J., McInerney, G. M., & McCracken, C. M. (2021). Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nature Communications*, 12(1), 21389. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21389-9>

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta Médica de México*, 157(1), 88–93. <https://doi.org/10.24875/GMM.20000505>

Scheiblhofer, S., Laimer, J., Machado, Y., Weiss, R., & Thalhamer, J. (2017). Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. *Expert Review of Vaccines*, 16(5), 479–489. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1306441>

Secretaría de Salud. (2020, 28 de Febrero). *Se confirma en México caso importado de coronavirus COVID-19*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/077-se-confirma-en-mexico-caso-importado-de-coronavirus-covid-19>

Secretaría de Salud. (2022). *Informe integral de COVID-19 en México*. https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/covid19/Info-06-22-Int_COVID-19.pdf

Secretaría de Salud. (2025). *Informe semanal de vigilancia epidemiológica de enfermedad respiratoria viral, semana 10 de 2025*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/983257/Informe_semanal_ERV_SE10_2025_10.03.2025.pdf

Shirota, H. (2017). CpG Oligodeoxynucleotides as adjuvants for clinical use. En *Immunopotentiators in Modern Vaccines* (2.^a ed., pp. 117–130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00009-8>

- Singh, D. D., Parveen, A., & Yadav, D. K. (2021). SARS-CoV-2: Emergence of new variants and effectiveness of vaccines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 777212. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.777212>
- Solís-Andrade, K. I., Olguín-Robles, E., García-Mena, J., Bañuelos-Hernández, B., Rosales-Mendoza, S., & Wong-Arce, A. (2022). Production and purification of an LTB-RBD chimeric protein as a vaccine candidate against COVID-19. *Vaccines*, 10(10), 1759. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101759>
- Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., et al. (2019). From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*, 11(1), 59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
- Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claër, L., ... Gorochov, G. (2021). IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Science Translational Medicine*, 13(577), eabd2223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03738-2>
- Turner, J. S., O'Halloran, J. A., Kalaidina, E., Kim, W., Schmitz, A. J., Zhou, J. Q., ... Ellebedy, A. H. (2021). SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature*, 596(7870), 109–113. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03738-2> Nature+1
- Vega Rojas, L. J., Ruíz-Manzano, R. A., Velasco-Elizondo, M. A., Carbajo-Mata, M. A., Hernández-Silva, D. J., Rocha-Solache, M., Hernández, J., Pérez-Serrano, R. M., Zaldívar-Lelo de Larrea, G., García-Gasca, T., & Mosqueda, J. (2024). An evaluation of the cellular and humoral response of a multi-epitope vaccine candidate against COVID-19 with different alum adjuvants. *Pathogens*, 13(12), 1081. <https://doi.org/10.3390/pathogens13121081>
- Vega-de LoPresti, Y., Montilva-Gutiérrez, E., Valenzuela-Vegas, A., Salazar-Pérez, K. E., Paredes-Manodanda, A. S., Alvarado-García, A. J., González-Zarraga, A. E., Suárez-

- Osorio, Y. K., Mendoza, M., Altamiranda, C. E., Altamiranda, C., Aparicio-de Marín, Y. L., Gómez, R., Villarreal, V., Salmen, Z., & Salmen, S. (2022). Cuantificación de la carga viral en el tracto respiratorio superior en pacientes con COVID-19 al ingreso hospitalario y su asociación con la gravedad de la enfermedad. *Gaceta Médica de México*, 158(5), 320–326. <https://doi.org/10.24875/gmm.22000021>
- Wen, X., Wen, K., Cao, D., Li, G., Jones, R. W., Li, J., Szu, S., Hoshino, Y., & Yuan, L. (2014). Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4⁺ T cell epitope P2 significantly enhanced the immunogenicity of recombinant rotavirus ΔVP8* subunit parenteral vaccines. *Vaccine*, 32(35), 4420–4427. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.060>
- WHO (2025). WHO position paper: Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children aged <5 years – September 2025. *Weekly Epidemiological Record*, 100(39), 411–437. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer10039-411-437>
- WHO. (2020). WHO guidelines on nonclinical and clinical evaluation of vaccines. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/annex1-nonclinical.p31-63>
- World Health Organization. WHO (2023). Tetanus: Immunization, vaccines and biologicals. World Health Organization. <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/tetanus>
- Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 523-534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
- Wong-Arce, A., González-Ortega, O., Romero-Maldonado, A., Miranda-López, A., García-Soto, M., Farfán-Castro, S., ... Rosales-Mendoza, S. (2024). Biotechnological production of the LTp50 chimeric antigen for a COVID-19 vaccine candidate: Expression, purification, refolding, and immunogenicity. *Pharmaceuticals*, 17(3), 302. <https://doi.org/10.3390/ph17030302>

- World Health Organization. WHO (2020). Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- World Health Organization: WHO. (2024, 26 abril). Declaración sobre la composición antigénica de las vacunas contra la COVID-19. *World Health Organization*. <https://www.who.int/es/news/item/26-04-2024-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines>
- Worobey, M., Levy, J. I., Malpica Serrano, L. M., Crits-Christoph, A., Pekar, J. E., Goldstein, S. A., ... & Andersen, K. G. (2021). Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. *Science*, 374(6572), 1202–1204. <https://doi.org/10.1126/science.abm4454>
- Xiao, E., Mirabel, C., Clénet, D., Zhu, S., James, A., Ettorre, L., Williams, T., Szeto, J., Rahman, N., & Ausar, S. F. (2024). Formulation development of a COVID-19 recombinant spike protein-based vaccine. *Vaccines*, 12(8), 830. <https://doi.org/10.3390/vaccines12080830>
- Xu, S.-w., Ilyas, I., & Weng, J.-p. (2022). Endothelial dysfunction in COVID-19: An overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. *Acta Pharmacologica Sinica*, 44(7), 695–709. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00841-0>
- Zhang, J., He, Q., Yan, X., Liu, J., Bai, Y., An, C., Cui, B., Gao, F., Mao, Q., Wang, J., Xu, M., & Liang, Z. (2022). Mixed formulation of mRNA and protein-based COVID-19 vaccines triggered superior neutralizing antibody responses. *MedComm*, 3(4), e188. <https://doi.org/10.1002/mco2.188>
- Zheng, M. Z. M., Wakim, L. M., & Smith, K. G. C. (2022). Tissue-resident memory T cells in the respiratory tract. *Mucosal Immunology*, 15(4), 625–636. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00461-z> Nature

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., et al. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>