

Carmen Rodríguez
Hernández¹
Juan Carlos Sanz Moreno²

Inmunidad frente a SARS-CoV-2: caminando hacia la vacunación

¹Servicio de Inmunología. Unidad de Gestión Clínica de Hematología, Inmunología y Genética. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz, España.

²Unidad de Microbiología Clínica. Laboratorio Regional de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid, Madrid, España.

Article history

Received: 11 August 2020; Revision Requested: 1 September 2020; Revision Received: 3 September 2020; Accepted: 3 September 2020; Published: 11 September 2020

RESUMEN

Los coronavirus (CoVs) son un amplio grupo de virus en el que se encuentra el SARS-CoV-2 (familia Coronaviridae, subfamilia Coronavirinae, género Betacoronavirus y subgénero Sarbecovirus). Sus principales proteínas estructurales son la de membrana (M), la de envoltura (E), la nucleocápside (N) y la espicular (S). La respuesta inmune frente a SARS-CoV-2 implica la vertiente celular y humoral, con anticuerpos neutralizantes potencialmente defensivos fundamentalmente dirigidos frente al antígeno S. Aunque los datos de seroprevalencia se asumen muy frecuentemente como marcadores de protección, no necesariamente lo son. En España se estima que al menos cuatro quintas partes de la población deberían estar inmuno-protegidas para asegurar la inmunidad de grupo. Dada la alta tasa de letalidad por COVID-19, la adquisición de esta protección únicamente mediante el contagio natural no es asumible y se debe abogar por otras medidas como puede ser la inmunización masiva. En la actualidad existen varios prototipos de vacunas (que incluyen virus vivos, vectores virológicos, péptidos y proteínas y ácidos nucleicos) en diversas etapas de evaluación clínica. Se prevé que en breve alguna de estas nuevas vacunas se encuentre ya disponible en el mercado. En este texto se revisan aspectos relacionados con estos asuntos.

Palabras clave: SARS-CoV-2, inmunidad, vacunación

Immunity against SARS-CoV-2: walking to the vaccination

ABSTRACT

The coronavirus are a wide group of viruses among that the SARS-CoV-2 is included (family Coronaviridae, subfamily Coronavirinae, genus Betacoronavirus and subgenus Sarbecovirus). Its main structural proteins are the membrane (M), the envelope (E), the nucleocapsid (N) and spike (S). The immune response to SARS-CoV-2 involves the cellular and the humoral sides, with neutralizing antibodies fundamentally directed against the S antigen. Although the seroprevalence data are frequently assumed as protection markers, no necessarily they are. In Spain, it is estimated that, to assure the herd immunity, at least four-fifths of the population should be immunoprotected. Due the high fatality rate of COVID-19, the acquisition of the protection only by the natural infection it not assumable and other measures as the mass immunization are required. Currently, there are several vaccine prototypes (including life virus, viral vectors, peptides and proteins and nucleic acid) in different phase of clinical evaluation. Foreseeably, some of these news vaccines would be son commercially available. In this text, aspects related to these issues are reviewed.

Key words: SARS-CoV-2, immunity, vaccination

INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19 ha supuesto un gran desastre sanitario y social que ha alterado drásticamente la forma vida de personas de todo el mundo. La mitigación de sus consecuencias reside, muy especialmente, en una prevención que resulte eficaz y pueda ser extensiva a gran parte de la población. Este documento se centra en aspectos que conciernen a la inmunidad, sero-protección y desarrollo de nuevas vacunas en fase de preparación frente al virus causante de esta enfermedad.

Correspondencia:
Dr. Juan Carlos Sanz Moreno
Unidad de Microbiología Clínica. Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. Dirección General de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. Centro de Especialidades Médicas Vicente Soldevilla 2ª planta. C/ Sierra de Alquife 8. Madrid 28053
Tfno.: 91 779 88 65.
E-mail: juan.sanz@salud.madrid.org

CARACTERÍSTICAS DE LOS CORONAVIRUS Y SARS-COV-2

Los coronavirus (CoVs) son un amplio grupo de virus ARN pertenecientes al orden Nidovirales que alberga a las familias Arteriviridae, Mesoniviridae, Roniviridae y Coronaviridae. Esta última se divide en las subfamilias Torovirinae y Coronavirinae. La subfamilia Coronavirinae incluye los géneros Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus [1]. El género Betacoronavirus posee los subgéneros Embecovirus, Hibecovirus, Merbecovirus, Nobecovirus y Sarbecovirus [2]. A este último pertenece el SARS-CoV-2 [3]. El acrónimo SARS-CoV-2 hace referencia al virus (por los términos en inglés "*severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*") responsable de la enfermedad denominada COVID-19 ("*coronavirus disease*" 2019).

Las principales proteínas estructurales de los coronavirus son la de membrana (M), la de envoltura (E), la nucleocápside (N) que liga el ARN y conforma la cápside y la espicular "*spike protein*" (S) [1]. En una porción de Betacoronavirus existe una quinta proteína estructural compuesta por la hemaglutinina-esterasa (HE) [1]. La proteína S es superficial, con forma de hongo, se une a la célula del huésped mediando la entrada del virus. Está compuesta por las subunidades S1 (que favorece la adhesión) y S2 (responsable de la fusión a la membrana) [4]. El dominio receptor de unión "*receptor binding domain*" (RBD) es la fracción de la subunidad S1 que se une a la enzima convertidora de angiotensina 2 "*angiotensin-converting enzyme*" 2 (ACE2) de la célula hospedadora [4, 5]. SARS-CoV-2 emplea esta enzima y la serina-proteasa TMPRSS2 para su penetración [6]. De esta forma, la proteína S podría ser una diana en la inhibición del acceso celular del virus [7].

RESPUESTA INMUNE FRENTE A CORONAVIRUS

En la inmunidad protectora frente a SARS-CoV-2 intervienen tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, en sus vertientes humoral y celular [8]. La respuesta frente a SARS-CoV-2 depende de la especificidad antigénica. Los principales antígenos del virus que exhiben capacidad neutralizante son el dominio N-terminal "*N-terminal domain*" (NTD) y el RBD de S1 y la S2 [9]. La respuesta generada por los linfocitos B frente a los coronavirus es protectora, pero de corta duración y orientada primariamente a la cepa homóloga [10]. Por otro lado, si bien la respuesta inmune es esencial para aclarar el virus, también contribuye a la progresión de la enfermedad [8]. En algunos pacientes, el sistema inmune no puede controlar el virus en la fase aguda, y tras una o dos semanas desde el inicio de los síntomas, se desarrolla daño pulmonar severo con "distrés" respiratorio (SDRA) que conlleva una alta mortalidad [11]. La progresión hacia SDRA está relacionada con una hiper-activación inmune, que se ha denominado síndrome de activación macrofágica y tormenta de citoquinas, en la que produce una liberación excesiva e incontrolada de mediadores pro-inflamatorios con un incremento de marcadores de activación de macrófagos. Los principales cambios inmunopato-

lógicos en COVID-19 incluyen linfopenia T (la caída de CD8+ es signo de mal pronóstico), desequilibrio de citoquinas, alteraciones Th1, eosinopenia y fluctuación de reactantes de fase aguda (con elevación de proteína C reactiva, procalcitonina e interleuquina 6) [12]. Estos cambios pueden desembocar en un fracaso multiorgánico.

SEROREPREVALENCIA

La tasa de seroconversión de IgM y especialmente de IgG en la COVID-19 es alta. En el caso del SARS-CoV (predecesor de SARS-CoV-2) la duración de IgM e IgA es de aproximadamente 6 meses. La IgG alcanza su pico a los cuatro meses y declina tras un año [10]. Los linfocitos T de memoria representarían un marcador correlacionado de protección que persiste hasta 6 años tras la infección [10]. Una potente reactividad celular T se relaciona con elevada producción de anticuerpos neutralizantes [13]. El empleo de distintos métodos de inmunodiagnóstico permite determinar la existencia de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2. La prevalencia de anticuerpos séricos frente a otros coronavirus humanos causantes de infecciones respiratorias leves y autolimitadas (como los Alphacoronavirus HCoV-229E y HCoV-NL63 y los Betacoronavirus HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 es elevada [1, 14]. Sin embargo, la reactividad cruzada tras la infección por un tipo de coronavirus distinto a SARS-CoV-2 (como el previo SARS CoV) parece ser limitada e incapaz de asegurar la total protección [15]. Se ha sugerido un posible reconocimiento antigénico cruzado por linfocitos T CD4+, a partir de coronavirus del resfriado común, en individuos no expuestos a SARS-CoV-2 que va dirigido mayoritariamente frente a la proteína S (pero en el que participarían también otros antígenos estructurales como M y N) [16]. Según los datos de estudios de seroprevalencia a gran escala emprendidos en nuestro país, la tasa de exposición a SARS-CoV-2 en la población general puede situarse próxima al 5% [17]. Esta cifra es más elevada en grupos de alta incidencia como los sanitarios [18]. No obstante, esta seroprevalencia no indica necesariamente protección. El procedimiento serológico definitivo para confirmar la presencia de anticuerpos protectores es el empleo de métodos de neutralización [19, 20]. El suero de personas convalescentes proporciona reactividad neutralizante cruzada frente al virus [6]. Esta reactividad hace referencia a la capacidad de los anticuerpos de evitar la infección por el virus. Para su realización se requiere enfrentar el suero con cultivos celulares del virus y determinar la inhibición del efecto citopático [21, 22]. Se desconoce el título de anticuerpos neutralizantes que confiere con certeza protección frente a SARS-CoV-2 [23]. Por motivos de bioseguridad, en lugar de emplear cepas salvajes de SARS-CoV-2 existen modelos que incorporan pseudovirus (partículas víricas desarrolladas in vitro que albergan un genoma modificado y expresan determinados antígenos como la proteína S) [24]. No todos los anticuerpos generados frente a los coronavirus poseen funcionalidad. Los anticuerpos neutralizantes IgG son secretados por linfocitos B tras la infección [25] y bloquean la entrada celular del virus y previniendo la reinfección. En la práctica, la puesta en marcha

de estudios de neutralización en muestras con un elevado número de participantes no es técnicamente viable. En estudios poblacionales amplios se pueden realizar con inmunoensayos que incorporan antígenos purificados y definidos de SARS-CoV-2. El tipo de antígeno empleado condiciona si el test sólo revela exposición previa frente al virus (ejemplo anticuerpos frente a al antígeno N) [26], o respuesta potencialmente defensiva (anticuerpos frente al antígeno RBD de la proteína S) [19]. Aunque los métodos serológicos dirigidos frente al antígeno S podrían usarse en el trabajo de campo para la ejecución de estudios poblacionales encaminados a la evaluación indirecta de protección [27], teniendo en mente que la inmunidad celular ofrece una defensa más persistente para prevenir la COVID-19, la utilización de ensayos para la detección específica de repuesta de células T gamma interferón constituye una alternativa diagnóstica muy atractiva [23, 28]. En la actualidad ya se dispone de procedimientos comerciales, destinados a determinar la respuesta de células T frente a SARS-CoV-2, que se basan en tecnologías previamente aplicadas (T-SPOT) en otras infecciones como tuberculosis.

INMUNIDAD DE GRUPO

Aunque los datos de seroprevalencia se asumen muy frecuentemente como marcadores de protección, no necesariamente lo son. El término inmunidad de grupo (o de rebaño) hace referencia a la protección que ejercen los individuos inmunes (con anticuerpos neutralizantes y/o respuesta celular defensiva eficiente adquiridos por la exposición natural o por una potencial vacunación) sobre los susceptibles al dificultar la transmisión de la infección. En el caso de la COVID-19, el nivel requerido en base a la infectividad del virus se ha estimado generalmente en torno al 70% [29]. En esta asunción intervienen conceptos como el número reproductivo básico (R_0), definido por los casos secundarios generados a partir de un sujeto infectado en una población completamente susceptible, y el número reproductivo efectivo (R_t), más adaptado a las condiciones reales, y que indica los casos secundarios a lo largo del

avance de la epidemia (en la que se irán incrementando los individuos inmunes tras la infección) [30]. Este R_t permite calcular el nivel crítico mínimo de inmunidad poblacional adquirido (P_{crit}) empleando la fórmula $P_{crit} = 1 - (1/R_t)$ y determinando el $P_{crit} \times 100$ que oscila en diferentes entornos entre el 30,1% y el 85,0% [30]. Las diferencias en comportamientos culturales, densidades de población, estructura demográfica, edad y asociación con comorbilidades influyen en la transmisión y severidad de la pandemia [29]. En España para un R_t provisional del 5,17% el $P_{crit} \times 100$ estimado es del 80,7% [30] (es decir al menos cuatro quintas partes de la población deberían estar inmuno-protegidas). La incidencia post-pandémica de COVID-19 durante los próximos años dependerá de forma importante de la duración de la inmunidad generada por la infección [31]. Dada la alta tasa de letalidad por COVID-19 la adquisición de un P_{crit} suficientemente elevado solamente mediante el contagio natural no es asumible y se debe abogar por medidas como la inmunización masiva [29, 32]. Hasta que se disponga de programas de inmunización con vacunas seguras y eficaces que confieran inmunidad de grupo es preciso mantener los programas de protección de grupos vulnerables y retomar, en su caso, actuaciones de aislamiento y distanciamiento social, en especial ante la eventual emergencia de re-brotos.

INMUNIZACIÓN

Entre las características esenciales de las vacunas habría que mencionar su seguridad (reducida posibilidad de aparición de efectos adversos y reacciones indeseables) y su eficacia (beneficios derivados de su aplicación por su capacidad protectora). En el desarrollo clínico de nuevas vacunas se suceden cuatro fases de evaluación [33]. La fase 1, que es experimental, se ejecuta en pocos sujetos sanos y examina básicamente la reactogenicidad más evidente. La fase 2, en ensayos clínicos controlados, se amplía a cientos de voluntarios y monitoriza la inmunogenicidad y la aparición de efectos adversos comunes. La fase 3 está destinada a determinar la eficacia y seguridad sobre eventos adversos más raros en grupos de cientos

Tabla 1 Distribución, según la metodología empleada para su diseño, de las vacunas candidatas frente a SARS-CoV-2 en el registro de la OMS de fecha 31 de julio de 2020 [38].

Tipo de vacuna	Evaluación clínica	Evaluación pre-clínica	En cualquier evaluación
Subunidades proteicas	7 (4,2%)	50 (30,3%)	57 (34,5%)
Vectores víricos no replicativos	4 (2,4%)	20 (12,1%)	24 (14,5%)
ARN	6 (3,6%)	16 (9,7%)	22 (13,3%)
Vectores víricos replicativos	0 (0%)	18 (10,9%)	18 (10,9%)
ADN	4 (2,4%)	11 (6,7%)	15 (9,1%)
Vacunas inactivadas	4 (2,4%)	9 (5,5%)	13 (7,9%)
Partículas similares a virus	1 (0,6%)	12 (7,3%)	13 (7,9%)
Vacunas vivas atenuadas	0 (0%)	3 (1,8%)	3 (1,8%)
Total	26 (15,8%)	139 (84,2%)	165 (100%)

Tabla 2

Vacunas frente a SARS-CoV-2 de acuerdo con sus características y fase de evaluación clínica [37, 38].

Tipo de vacuna	Ventajas	Inconvenientes	Ejemplo Vacunas de este tipo en Fase 3 ^a	Ejemplo Vacunas de este tipo en Fase 2 ^a	Ejemplo Vacunas de este tipo en Fase 1/2 o Fase 1 ^a
Subunidades proteicas	No incluye material infeccioso Intensa respuesta humoral	Precisa co-adyuvantes		Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutica/Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences	Novavax Kentucky Bioprocessing, Inc Clover Biopharmaceutics Inc./GSK/Dynavax Vaxine Pty Ltd/Medytox University of Queensland/CSI/Seqirus Medigen Vaccine Biologics Corporation/NIAD/Dynavax
Vectores víricos no replicativos	Experiencia en el campo de terapia genética Intensa respuesta humoral Intensa respuesta celular	Riesgo de integración cromosómica y oncogénesis Posibilidad de anticuerpos pre-existentes frente al vector Potencial inflamatorio	University of Oxford/AstraZeneca (ChAdOx1-S)	CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology	Janssen Pharmaceutical Companies Gamaleya Research Institute
ARN	No incluye material infeccioso No potencial de mutagénesis Diseño y producción rápidos Intensa respuesta humoral Intensa respuesta celular Posibilidad de formulación multivalente	Escasa experiencia Posibles reacciones inflamatorias Suele precisar "booster"	Moderna/NIAD BioNTech/Fosun Pharma/Pfizer		Arcturus/Duke-NUS Imperial College London Curevac People's Liberation Army (PLA) Academy of Military Sciences/Walvax Biotech
Vectores víricos replicativos	Experiencia en el campo de terapia genética Intensa respuesta de anticuerpos Intensa respuesta celular	Riesgo de integración cromosómica y oncogénesis Posibilidad de anticuerpos pre-existentes frente al vector Potencial inflamatorio			Por el momento no hay vacunas de este tipo en fase de evaluación clínica
ADN	No incluye material infeccioso Posibilidad de uso en inmunocomprometidos Diseño y producción rápidos Estabilidad prolongada Posibilidad de formulación multivalente	Escasa experiencia Inmunidad de mucosas variable Riesgo de integración cromosómica			Inovio Pharmaceuticals/International Vaccine Institute Osaka University/ AnGes/ Takara Bio Cadila Healthcare Limited Genexine Consortium
Vacunas inactivadas	Tecnología conocida Fuerte respuesta inmune Multivalencia Formulación simple No precisa co-adyuvantes	Requerimientos de bioseguridad Dificultad de fabricación	Sinovac Wuhan Institute of Biological Products/ Sinopharm Beijing Institute of Biological Products/ Sinopharm		Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences Bharat Biotech
Partículas similares a virus	No incluye material infeccioso Intensa respuesta humoral				Medicago Inc
Vacunas vivas atenuadas	Tecnología conocida Fuerte respuesta inmune Multivalencia Formulación simple No precisa co-adyuvantes Producción económica	Requerimientos de bioseguridad Riesgo de recuperación de la virulencia Dificultad de fabricación			Por el momento no hay vacunas de este tipo en fase de evaluación clínica

^aRegistro de la OMS (a fecha 31 de julio de 2020) de vacunas candidatas frente a SARS-CoV-2

a miles de personas (puede abarcar estudios controlados y no controlados). La fase 4 se amplía a grandes grupos de población (incluidos grupos vulnerables o de riesgo) para valorar la incidencia a largo plazo de reacciones indeseadas. A pesar de la urgencia derivada por la actual pandemia, la necesidad del cumplimiento secuencial de estas fases ralentiza la disponibilidad de nuevas vacunas. No obstante, los logros alcanzados tan brevemente (sólo unos meses tras el descubrimiento del virus) hacia la vacunación de la COVID-19 no son comparables a los de ninguna otra enfermedad infecciosa previa. Existen dos aproximaciones de inmunización: la pasiva y la activa. La inmunización pasiva tiene versiones tanto profilácticas como terapéuticas y puede efectuarse mediante transferencia de inmunoglobulinas (por ejemplo, con plasma de sujetos convalecientes, suero hiper-immune o anticuerpos neutralizantes monoclonales). Sin embargo, cuando se piensa en vacunación, en general se hace referencia realmente a la inmunización activa, a través de la inducción de una respuesta en el huésped por estimulación antigénica. En esta última estrategia es en la que nos centraremos a continuación. Idealmente las vacunas frente a SARS-CoV-2 deberían estimular tanto la inmunidad celular como la humoral. Tras la vacunación, la respuesta específica de células de T parece adelantarse al menos una semana respecto a la humoral [34]. La tecnología implementada en las vacunas frente a SARS-CoV-2 es diversa e incluye virus vivos enteros atenuados e inactivados, vectores virológicos (replicativos y no replicativos que expresen un antígeno relevante), partículas similares a virus, péptidos, proteínas recombinantes, células presentadoras de antígeno y ácidos nucleicos (ADN y ARN) [35-37]. Las vacunas de ácidos nucleicos constituyen la alternativa de inmunización más novedosa y se sustentan en la transferencia genética para la síntesis endógena de proteínas del virus por las células del receptor sin una estimulación antigénica directa. A fecha 31 de julio de 2020 la OMS [38] recopiló un registro de 165 vacunas en investigación. Ciento treinta y nueve de ellas estaban en fase preclínica y 26 se encontraban ya sujetas a evaluación clínica (5 en fase 3, 2 en fase 2, 10 en fase 1,2 y 9 en fase 1). De estas 165 vacunas la distribución según tipo se muestra en la tabla 1. En la tabla 2 se presentan varios ejemplos de vacunas frente a SARS-CoV-2 según sus bases metodológicas y etapas de valoración clínica. Las aproximaciones más frecuentes son las que implican subunidades proteicas, vectores víricos replicativos y ácidos nucleicos. Las vacunas clásicas con virus atenuados han sido menos investigadas por sus potenciales riesgos asociados. En las vacunas que emplean vectores, como adenovirus, aunque la respuesta inmune es dosis dependiente [39], la aparición de reacciones adversas es mayor al aumentar la carga viral [40]. En las vacunas de ácidos nucleicos las reacciones adversas también se incrementan en relación con la dosis [41]. En España, existen grupos punteros de investigación, con líneas de inmunización frente al virus de inmunodeficiencia humana [42, 43] y vectores vacunales para otros virus (como Zika) [44] y con modelos de coronavirus basados en sistemas genéticos de síntesis de ARN [45] con interacción con el huésped para dar lugar a respuestas protectoras [46]. Esto ha permitido

plantear varias vacunas que se encuentran en fase pre-clínica, como las de vectores víricos no replicativos MVA-S (del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer [IDIBAPS] del Hospital Clínic de Barcelona) y la MVA con expresión de proteínas estructurales (del Centro Nacional de Biotecnología del Centro Superior de Investigaciones Científicas [CNB-CSIC]) y de ácidos nucleicos como la de ARNm (del DIBAPS) y de ARN derivado de virus SARS-CoV-2 defectivo (del CNB-CSIC) [38]. A nivel mundial, las vacunas que han alcanzado actualmente la etapa final de pruebas en humanos (antes de ser aprobadas para el uso público) son las inactivadas (de Sinovac, Wuhan Institute of Biological Products/Sinopharm, Beijing Institute of Biological Products/Sinopharm), las de ARN (de Moderna/NIAID y de BioNTech/Fosun Pharma/Pfizer) y la de vectores víricos no replicativos (de Oxford/AstraZeneca) [38]. Se espera que alguna de ellas pueda estar disponible este mismo año o comienzos del próximo.

En conclusión, los avances en el conocimiento de los determinantes antigénicos de SARS-CoV-2 y de su correspondiente respuesta inmune abren horizontes optimistas sobre las actuales perspectivas de vacunación y plantean un futuro cada vez más concreto para la atenuación, y en el mejor de los casos resolución, de la crisis sanitaria que estamos sufriendo. Las nuevas vacunas deberían cumplir con los requisitos deseables de accesibilidad económica y equidad socio-sanitaria que permitan idealmente su disponibilidad universal.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses que puedan influir en lo expresado en este texto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015;1282:1-23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
2. Wassenaar TM, Zou Y. 2019_nCoV/SARS-CoV-2: rapid classification of betacoronaviruses and identification of Traditional Chinese Medicine as potential origin of zoonotic coronaviruses. *Lett Appl Microbiol.* 2020;70(5):342-348. doi:10.1111/lam.13285
3. Zheng J. SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int J Biol Sci.* 2020;16(10):1678-1685. doi: 10.7150/ijbs.45053. <http://www.ijbs.com/v16p1678.htm>
4. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;581(7807):215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5
5. Yi C, Sun X, Ye J, Ding L, Liu M, Yang Z, et al. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cell Mol Immunol.* 2020;1-10. doi:10.1038/s41423-020-0458-z "en prensa"
6. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and

- TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
7. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Vesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
 8. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 2020;52(6):971-977.e3. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.023
 9. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol*. 2020;41(5):355-359. doi:10.1016/j.it.2020.03.007
 10. Channappanavar R, Zhao J, Perlman S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):118-128. doi:10.1007/s12026-014-8534-z
 11. Lin L, Lu L, Cao W, Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):727-732. doi:10.1080/22221751.2020.1746199
 12. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggem MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020;75(7):1564-1581. doi:10.1111/all.14364
 13. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol*. 2020;30(3):e2107. doi:10.1002/rmv.2107
 14. Gorse GJ, Patel GB, Vitale JN, O'Connor TZ. Prevalence of antibodies to four human coronaviruses is lower in nasal secretions than in serum. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(12):1875-1880. doi:10.1128/CVI.00278-10 <https://cvi.asm.org/content/cdli/17/12/1875.full.pdf>
 15. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1):1620. Published 2020 Mar 27. doi:10.1038/s41467-020-15562-9
 16. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
 17. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Oteo J, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, et al. ENE-COVID Study Group. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020;S0140-6736(20)31483-5. doi:10.1016/S0140-6736(20)31483-5
 18. Garcia-Basteiro AL, Moncunill G, Tortajada M, Vidal M, Guinovart C, Jiménez A, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among health care workers in a large Spanish reference hospital. *Nat Commun*. 2020;11(1):3500. doi:10.1038/s41467-020-17318-x
 19. Perera RA, Mok CK, Tsang OT, Lv H, Ko RL, Wu NC, et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(16):2000421. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.2000421
 20. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):680-686. doi:10.1080/22221751.2020.1743767
 21. Manenti A, Maggetti M, Casa E, Martinuzzi D, Torelli A, Trombetta CM, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a CPE-based colorimetric live virus micro-neutralization assay in human serum samples. *J Med Virol*. 2020;10.1002/jmv.25986. doi:10.1002/jmv.25986 "en prensa"
 22. Calderaro A, Arcangeletti MC, De Conto F, Buttrini M, Montagna P, Montecchini S, et al. SARS-CoV-2 infection diagnosed only by cell culture isolation before the local outbreak in an Italian seven-week-old suckling baby. *Int J Infect Dis*. 2020;96:387-389. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.035 "en prensa"
 23. Manners C, Larios Bautista E, Sidoti H, Lopez OJ. Protective Adaptive Immunity Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Implications for Vaccines. *Cureus*. 2020;12(6):e8399. doi:10.7759/cureus.8399
 24. Won J, Lee S, Park M, Kim TY, Park MG, Choi BY, et al. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp Neurobiol*. 2020;29(2):107-119. doi:10.5607/en20009
 25. Cao Y, Su B, Guo X, Sun W, Deng Y, Bao L, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells. *Cell*. 2020;10.1016/j.cell.2020.05.025. doi:10.1016/j.cell.2020.05.025 "en prensa"
 26. Bryan A, Pepper G, Wener MH, Fink SL, Morishima C, Chaudhary A, et al. Performance Characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG Assay and Seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol*. 2020 Jul 23;58(8):e00941-20. doi:10.1128/JCM.00941-20
 27. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):10.3201/eid2607.200841. doi:10.3201/eid2607.200841
 28. Melgaço JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: What can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol*. 2020;353:104114. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104114
 29. Randolph HE, Barreiro LB. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2020;52(5):737-741. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.012
 30. Kwok KO, Lai F, Wei WI, Wong SYS, Tang JWT. Herd immunity – estimating the level required to halt the COVID-19 epidemics in affected countries. *J Infect*. 2020;80(6):e32-e33. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.027
 31. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020;368(6493):860-868. doi:10.1126/science.abb5793
 32. Clemente-Suárez VJ, Hormeño-Holgado A, Jiménez M, Benitez-

- Agudelo JC, Navarro-Jiménez E, Perez-Palencia N, et al. Dynamics of Population Immunity Due to the Herd Effect in the COVID-19 Pandemic. *Vaccines* (Basel). 2020;8(2):E236. doi:10.3390/vaccines8020236
33. Tozzi AE. Field evaluation of vaccine safety. *Vaccine*. 2004;22(15-16):2091-2095. doi:10.1016/j.vaccine.2004.01.013
34. Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020;395(10240):1845-1854. doi:10.1016/S0140-6736(20)31208-3
35. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollefsen S, Saville M, et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(5):305-306. doi:10.1038/d41573-020-00073-5
36. Chen WH, Strych U, Hotez PJ, Bottazzi ME. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. *Curr Trop Med Rep*. 2020:1-4. doi:10.1007/s40475-020-00201-6
37. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic. *Front Pharmacol*. 2020;11:937. doi:10.3389/fphar.2020.00937
38. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
39. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396:467-478. doi:10.1016/S0140-6736(20)31604-4
40. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2020;396:479-488. doi:10.1016/S0140-6736(20)31605-6
41. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020:NEJMoa2022483. doi:10.1056/NEJMoa2022483
42. Guardo AC, Alvarez-Fernández C, Arberas H, García-Pérez J, García F, Bargalló ME, et al. Use of RT-defective HIV virions: new tool to evaluate specific response in chronic asymptomatic HIV-infected individuals. *PLoS One*. 2013;8(3):e58927. doi:10.1371/journal.pone.0058927
43. García F, Plana M, Climent N, León A, Gatell JM, Gallart T. Dendritic cell based vaccines for HIV infection: the way ahead. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(11):2445-52. doi:10.4161/hv.25876
44. Pérez P, Marín MQ, Lázaro-Frías A, Jiménez de Oya N, Blázquez AB, Escribano-Romero E, et al. A Vaccine Based on a Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Expressing Zika Virus Structural Proteins Controls Zika Virus Replication in Mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):17385. doi:10.1038/s41598-018-35724-6
45. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015;2(1):265-88. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055218
46. Enjuanes L, Zúñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus Res*. 2016;96:245-286. doi:10.1016/bs.aivir.2016.08.003