

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 766**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2021 PCT/EP2021/059583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2021 WO21209463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2021 E 21717462 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 4004547**

54 Título: **Métodos para detectar la presencia de anticuerpos específicos para coronavirus en un sujeto**

30 Prioridad:

**14.04.2020 EP 20315157  
09.06.2020 EP 20305614**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.04.2024**

73 Titular/es:

**(INSERM) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)  
101 rue Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE (33.3%) y  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE ROUEN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BOYER, OLIVIER y  
DROUOT, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 966 766 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para detectar la presencia de anticuerpos específicos para coronavirus en un sujeto

Campo de la invención:

La presente invención pertenece al campo de la medicina, en particular inmunología y virología.

## 5 Antecedentes de la invención:

*Coronaviridae* es una familia de virus envueltos, de sentido-positivo, de ARN de hebra-sencilla. El genoma viral tiene 26-32 kilobases de longitud. Las partículas suelen estar decoradas con proyecciones superficiales grandes (~20 nm), en forma de mazo- o de pétalo- (los "peplómeros" o "espículas"), que en las micrografías electrónicas de partículas esféricas crean una imagen reminiscente a la corona solar. A finales de diciembre de 2019, surgió un nuevo betacoronavirus SARS-CoV-2 en Wuhan, China [1-3]. La Organización Mundial de la Salud ha denominado a la neumonía grave causada por este nuevo coronavirus COVID-19 (por enfermedad de Coronavirus 2019, OMS, 2020). Desde su aparición, el SARS-CoV-2 se ha extendido a 159 países a través los cinco continentes provocando, en el momento de la escritura, alrededor de 213,254 infecciones humanas, con 81,238 casos en China (ECDC, 19 de marzo de 2020). Europa se ha convertido recientemente en el epicentro de la epidemia de COVID-19 con 82,869 casos confirmados; la mayoría de ellos se reportaron en Italia con 35,713 casos y 2978 muertes. En Francia, el número de casos confirmados está aumentando con alrededor de 10,995 y 372 muertes a mediados de marzo de 2020 (Santé Publique France). Para luchar a largo plazo contra la pandemia de COVID-19, además de las medidas de contención implementadas en muchos países, métodos de diagnóstico confiables son altamente deseables.

El estándar de referencia de la prueba molecular para el diagnóstico de COVID-19 es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), la cual detecta el ARN viral utilizando hisopados nasofaríngeos u otros especímenes del tracto respiratorio superior. Por lo tanto, RT-PCR sigue siendo el método primario para diagnosticar SARS-CoV-2 a pesar de las limitaciones que incluyen resultados falsos-negativos o falsos-positivos debido a la técnica en sí misma, cantidad insuficiente de material en el lugar de recolección de la muestra o momento inadecuado de muestreo. Las pruebas serológicas son complementos esenciales a las pruebas moleculares porque permiten identificar individuos con SARS-CoV-2 a distancia de la infección, cuando RT-PCR ha resultado negativa o no ha sido concluyente.

Además del diagnóstico, las pruebas serológicas son útiles para fines epidemiológicos, investigaciones sobre vacunación y, posiblemente, para evaluar el nivel de protección contra la reinfección. Los ensayos serológicos evalúan la respuesta inmune humoral a las proteínas de nucleocápside (N) o Espículas (S), ya que se ha demostrado que son las proteínas más inmunogénicas entre los coronavirus (Meyer et al., 2014). En particular, el desarrollo y la disponibilidad de pruebas para la detección y cuantificación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en sujetos con COVID-19 es de gran interés diagnóstico. De forma individual, potencialmente proporcionarían información sobre el estado de protección contra la reinfección. También harían posible determinar a posteriori el nivel de exposición de la población al virus, constituyendo así un elemento que podría guiar una estrategia de contención o de levantamiento de la contención.

Las pruebas serológicas incluyen inmunoensayos de flujo lateral (LFIAs), ensayos quimioluminiscentes (CLIA), ensayos basados en perlas, luminiscencia inmunométrica, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Las pruebas suelen detectar la presencia de anticuerpos (Abs) contra la proteína S o sus dominios (S 1, S2 o RBD) y/o la proteína N. La sensibilidad de los inmunoensayos para SARS-CoV-2 puede variar ampliamente según el momento en que se recolectaron las muestras de suero, siendo mayor la sensibilidad de los CLIA y ELISAs que de los LFIAs, mientras que la especificidad de las diferentes pruebas suele ser superior que el 95% (Lisboa Bastos et al., 2020).

Hasta la fecha, además de las pruebas rápidas no-cuantitativas, solamente se han reportado pruebas basadas en el método ELISA, CLIA o LFIA.

45 En un estudio reciente, Cai et al. desarrollaron un inmunoensayo luminiscente basado en péptidos para detectar IgG e IgM anti-proteína S en los 276 sueros de pacientes confirmados. Ellos evaluaron la sensibilidad de la prueba en 71.4%, 57.2% y 81.5% para IgG, IgM e IgM + G respectivamente.

50 En otro estudio reciente, Guo et al. analizaron la respuesta humoral (IgA, IgM e IgG) en 82 pacientes confirmados y 58 sujetos sospechosos para COVID-19 (qPCR negativa, pero signos clínicos sugestivos). Mediante una prueba ELISA que utiliza como antígeno la proteína N recombinante de la cápside, detectaron IgM e IgA anti-nucleocápside 5 días después del inicio de los primeros síntomas y 14 días para IgG. Los niveles séricos positivos fueron 85, 93 y 78% respectivamente. La positividad de IgM anti-nucleocápside N entre sujetos positivos y probablemente infectados fue 76% y 93% respectivamente. Los autores también demostraron que una prueba serológica como ésta permitía un diagnóstico más temprano de la enfermedad en comparación con la PCR cuantitativa la cual se basa en la detección del genoma viral con una técnica posiblemente menos sensible. Además, la combinación de las dos técnicas aumentó significativamente la tasa de detección de sueros positivos al 98.6% (Guo, 2020).

5 Xiang y colegas, utilizando un ELISA de Zhu Hai Liv Zon Diagnostics, evaluaron la sensibilidad de la prueba en 44, 82 y 87% para IgM, IgG e IgM + G respectivamente para una especificidad del 100 %. La reproducibilidad fue del 64, 89 y 92%, respectivamente. El uso combinado de un ELISA de IgM y un ELISA de IgG (aquí denominado ELISA de IgM + G) parece ser incluso más sensible que la qPCR (87% versus 52%). Sin embargo, se desconoce el antígeno utilizado en este estudio.

En otro estudio, Xia et al. hicieron un trabajo similar con un ELISA usando un antígeno no especificado y llegaron a la misma conclusión. La sensibilidad del ELISA IgM + G combinado es superior a la de los ELISA de clase sencilla y a la de la qPCR.

10 EUROIMMUN desarrolla ELISAs utilizando diferentes proteínas del coronavirus, incluida la proteína Espícula del SARS-CoV-2 producida en las células HEK293T. Utilizando esta prueba en desarrollo, Okba y sus colaboradores han demostrado reactividad cruzada entre diferentes coronavirus.

15 Liu y colegas, utilizando un ELISA anti-nucleocápside y proteína S de Lizhu (Zhuhai, China), detectaron IgM e IgG anti-SARS-Cov-2 con alta sensibilidad en 214 pacientes. La combinación IgM + G ofrece mayor sensibilidad que los ELISAs que detectan una sola clase de inmunoglobulina (IgM o IgG). Finalmente, el ELISA anti-proteína S es más sensible que el ELISA anti-nucleocápside. Finalmente, Liu y colegas del mismo laboratorio puen concluyeron con un ELISA anti-nucleocápside que la sensibilidad de esta prueba también era mayor que la de la qPCR.

20 El método ELISA tiene la ventaja de que puede utilizarse en muchos laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, el método ELISA requiere una gran cantidad de proteína antigénica por punto de medición, lo que repercute en el precio de coste. No permite la detección simultánea de varios anticuerpos en el mismo pocillo, lo que sería útil en el contexto de una respuesta antiviral contra varios antígenos.

25 El método de inmunoensayo con perlas láser direccionables (ALBIA) basado en la tecnología Luminex™ se basa en el principio de la citometría de flujo. Combina el uso de microperlas de poliestireno fluorescentes sobre las cuales se fijan los antígenos diana y una doble lectura mediante dos láseres que detectan las señales emitidas por las microperlas y un anticuerpo secundario acoplado. Utilizando un panel de perlas acopladas a diferentes antígenos y que contienen una proporción diferente de fluorescencia roja y naranja, es posible multiplexar los ensayos y detectar varios anticuerpos en el mismo pocillo. Sin embargo, dicho método aún no ha sido investigado aún para el diagnóstico de la infección por coronavirus.

Sumario de la invención:

30 Como se define por las reivindicaciones, la presente invención se refiere a métodos para detectar la presencia de anticuerpos específicos para SARS-Cov-2 en un sujeto.

Descripción detallada del invento:

35 Aquí, los inventores han desarrollado un inmunoensayo con perlas láser direccionables múltiplex (ALBIA) para detectar y cuantificar Abs IgG contra el dominio Espícula S1 y la nucleocápside N del SARS-Cov-2, y un ALBIA monoplex para analizar Abs IgM anti-S1. Las proteínas recombinantes S1 y N se unieron a perlas fluorescentes (ALBIA-IgG-S 1/N). Los Abs se revelaron utilizando Abs Ig anti-humano clase-específicos. Los resultados de la prueba se analizaron en 575 muestras de suero, incluyendo 192 de pacientes confirmados con reacción en cadena de la polimerasa para SARS-CoV-2, 13 de coronavirus estacionales, 70 de diferentes enfermedades inflamatorias/autoinmunes y 300 de donadores sanos. Las IgM anti-S1 se detectaron mediante ALBIA-IgM-S1 monoplex. ALBIA-IgG-S1/N multiplex fue eficaz en la detección y cuantificación de Abs IgG anti-SARS-CoV-2. Dos semanas después de los primeros síntomas, la sensibilidad y la especificidad fueron de 97.7 y 98.0% (anti-S1) y del 100 y 98.7% (anti-N), respectivamente.

En consecuencia, el primer objetivo de la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de anticuerpos específicos para SARS-Cov-2 en un sujeto, que comprende los pasos de:

45 a) colocar una muestra obtenida del sujeto en un único receptáculo del ensayo, en presencia de una pluralidad de partículas que pertenecen a al menos dos grupos diferentes, estando uno de los grupos conjugado con un primer polipéptido coronaviral y un otro grupo estando conjugado con un segundo polipéptido coronaviral,

b) incubar la mezcla bajo condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos en cada grupo de partículas,

c) eliminar de la mezcla del paso b) las inmunoglobulinas que no se han unido a las partículas,

d) incubar la mezcla del paso c) con al menos un anticuerpo IgG anti-humano que está acoplado a un marcador fluorescente;

50 e) eliminar de la mezcla del paso d) la IgG anti-humano no unida a los inmunocomplejos formados en el paso b), y

f) detectar simultáneamente, por medio de un detector capaz de diferenciar los al menos dos grupos de partículas mencionados anteriormente, los inmunocomplejos formados en el paso d) en cada partícula, con lo que se revela la

presencia o ausencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 y en el que se mide la fluorescencia de la etiqueta fluorescente para cuantificar los anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 detectados,

en el que uno del primer y segundo polipéptido coronaviral deriva de la nucleoproteína (N) del SARS-CoV-2 y el otro polipéptido coronaviral deriva de la subunidad S 1 de la proteína de espícula (S) del SARS-CoV-2.

5 SARS-CoV-2 es un coronavirus cuyo genoma es un ARN de cadena-positiva de alrededor de 27 kb a alrededor de 33 kb de longitud, dependiendo del virus en particular. El ARN de virión tiene una tapa en el extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'. La longitud del ARN hace que los coronavirus sean los genomas de virus de ARN más grandes. En particular, los ARN del SARS-CoV-2 codifican para: (1) una ARN polimerasa dependiente de ARN; (2) proteína-N; (3) tres glicoproteínas de envoltura; más (4) tres proteínas no estructurales. En particular, la partícula del SARS-CoV-2  
10 comprende al menos las cuatro proteínas estructurales canónicas E (proteína de la envoltura), M (proteína de la membrana), N (proteína de la nucleocápside) y S (proteína de la espícula). La proteína S se escinde en 3 cadenas: proteína Espícula S1, proteína Espícula S2 y proteína Espícula S2'. La producción de las proteínas replicasa se inicia por la traducción de ORF1a y ORF1ab mediante un mecanismo de cambio de marco ribosomal -1. Este mecanismo produce dos grandes poliproteínas virales, ppla y pplab, que son procesadas adicionalmente por dos cisteína proteasas codificadas viralmente, la proteasa tipo papaína (PLpro) y una proteasa tipo 3C (3CLpro), que a veces se denomina proteasa principal (Mpro). El SARS-CoV-2 se transmite por aerosoles de secreciones respiratorias.

En algunas realizaciones, el sujeto puede ser humano o cualquier otro animal susceptible a la infección por SARS-CoV-2 (por ejemplo, animales domésticos como gatos y perros; ganado y animales de granja como caballos, vacas, cerdos, pollos, etc.). En algunas realizaciones, el sujeto es un animal no-humano. En algunas realizaciones, el sujeto  
20 es un animal de granja o una mascota. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano infante. En algunas realizaciones, el sujeto es un niño humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano adulto. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano anciano. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano infante prematuro.

En algunas realizaciones, el sujeto puede ser sintomático o asintomático. Como se utiliza en la presente, el término "asintomático" se refiere a un sujeto que experimenta síntomas no detectables de la infección por SARS-CoV-2. Como se utiliza en la presente, el término "sintomático" se refiere a un sujeto que experimenta síntomas detectables de infección por SARS-CoV-2. Los síntomas de infección por SARS-CoV-2 incluyen: fatiga, anosmia, dolor de cabeza, tos, fiebre, dificultad para respirar.

Tal como se utiliza en la presente, el término "muestra" se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación in vitro. Las muestras biológicas típicas que se utilizarán en el método de acuerdo con la invención son muestras de sangre (por ejemplo, muestra de sangre total o muestra de suero). En algunas realizaciones, dichos líquidos biológicos comprenden sangre, plasma, suero, saliva y exudados. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la muestra se elige de muestras de sangre, muestras de plasma, muestras de saliva, muestras de exudado y muestras de suero. Preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre, una muestra de suero o una muestra de plasma.

35 Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo", "inmunoglobulinas" o "Igs" tiene su significado general en la técnica y se relaciona con proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas se caracterizan por un dominio estructural, es decir, el dominio de inmunoglobulina, que tiene un plegamiento característico de inmunoglobulina (Ig). El término abarca inmunoglobulinas secretoras. Las inmunoglobulinas generalmente comprenden varias cadenas, típicamente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas mediante enlaces disulfuro. Estas cadenas están compuestas principalmente por dominios de inmunoglobulina, incluido el dominio VL (dominio variable de cadena ligera), el dominio CL (dominio constante de cadena ligera), el dominio VH (dominio variable de cadena pesada) y los dominios CH (dominios constantes de cadena pesada) CH1, opcionalmente una región bisagra, CH2, CH3 y opcionalmente CH4. Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: mu ( $\mu$ ) para IgM, delta ( $\delta$ ) para IgD, gamma ( $\gamma$ ) para IgG, alfa ( $\alpha$ ) para IgA y épsilon ( $\epsilon$ ) para IgE. En el contexto de la invención se detectan IgG específicas para las proteínas S1 y N. Otras inmunoglobulinas que pueden detectarse, además de dichas IgG, son IgM, IgD, IgG, IgA o IgE. Como bien sabe el experto en la técnica, el isotipo IgG abarca cuatro subclases: las subclases IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. El isotipo IgA engloba 2 subclases: inmunoglobulinas IgA1 e IgA2.

50 Como se utiliza en la presente, el término "partícula" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una partícula de 1 nm a 1000 nm, preferiblemente de 100 a 500 nm e incluso más preferiblemente de 350 a 450 nm de tamaño. En algunas realizaciones, el tamaño de la partícula es de alrededor de 400 nm. Por lo general una partícula puede ser esférica, aunque la forma no se limita a la de una esfera y puede incluir otras formas como esferoide, partículas irregulares, cubos, cubos irregulares y discos. De acuerdo con la presente invención el término "partícula" es intercambiable con el término "perla".

55 En algunas realizaciones, la partícula de la presente invención está hecha de un polímero orgánico. Los polímeros orgánicos abarcan, pero no se limitan, poliestireno, poli(acetato de vinilo), poli(metilestireno), poli(acrilamida), poli(acrilonitrilo), poli(cloruro de vinilo), poli(acrilato de butilo), poli(ácido acrílico), copolímeros de estireno y (met)acrilato de alquilo C 1-C4, copolímeros de estireno y acrilamida, copolímeros de estireno y acrilonitrilo, copolímeros de estireno y acetato de vinilo, copolímeros de acrilamida y (met)acrilatos de alquilo C1-C4, copolímeros

de acrilonitrilo y (met)acrilato de alquilo C1-C4, copolímeros de acrilonitrilo y acrilamida, terpolímeros de estireno, acrilonitrilo y acrilamida, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), copolímeros de estireno/butadieno, estireno/ácido acrílico, estireno/vinilpirrolidona y butadieno/acrilonitrilo, o copolímero de metoxi poli(etilenglicol)-poli(lactida) (MPEG-PLA). Las partículas de polímero pueden estar entrecruzadas o no. Por ejemplo, las partículas orgánicas incluyen, pero no se limitan a, nailon (por ejemplo comercializado por ATOCHEM), polvos de polietileno (por ejemplo comercializados por PLAST LABOR), polvos de poli-2-alanina, polvos polifluorados tales como politetrafluoroetileno (por ejemplo comercializados por DUPONT DE NEMOURS), polvos de copolímero acrílico (por ejemplo comercializados por DOW CHEMICA), polvos de poliestireno (por ejemplo comercializados por PRESPERESE), polvos de poliéster, microesferas expandidas en material termoplástico (por ejemplo comercializados por EXPANCEL), microbolas de resinas de silicón (por ejemplo comercializados por TOSHIBA), polvos de polímeros hidrofílicos sintéticos tales como poli(acrilatos) (por ejemplo comercializados por MATSUMOTO), poliamidas acrílicas (por ejemplo comercializadas por ORIS), poliuretanos insolubles (por ejemplo comercializados por TOSHNU), microesferas porosas de celulosa, micro- o partículas de PTFE (politetrafluoroetileno).

En algunas realizaciones, las partículas se seleccionan para que tengan una variedad de propiedades útiles para los formatos experimentales particulares. Por ejemplo, se pueden seleccionar partículas que permanezcan suspendidas en una solución de viscosidad deseada o que precipiten fácilmente en una solución de viscosidad deseada. Las partículas también pueden codificarse con fines de identificación, tales como mediante códigos de barras, luminiscencia, fluorescencia y similares. Los expertos en la técnica conocen bien una variedad de partículas codificadas e incluyen, por ejemplo, partículas codificadas Luminex® y Cyvera®. Con respecto a las partículas codificadas, cada partícula puede incluir un código único, preferiblemente, las partículas codificadas contienen un código distinto del presente en la etiqueta detectable utilizada para detectar la presencia o cantidad de sustrato modificado (por ejemplo, porción de producto unido al soporte, porción del producto libre o sustrato modificado unido al soporte). El código puede estar incrustado (por ejemplo, dentro del interior de la partícula) o unirse de otro modo a la partícula de una manera que sea estable mediante hibridación y análisis. El código puede proporcionarse mediante cualquier medio detectable, tal como mediante codificación holográfica, mediante una propiedad de fluorescencia, color, forma, tamaño, emisión de luz, emisión de puntos cuánticos y similares para identificar partículas y, por lo tanto, las sondas de captura inmovilizadas en las mismas. Por ejemplo, las partículas pueden codificarse utilizando etiquetas ópticas, químicas, físicas o electrónicas. Ejemplos de tales tecnologías de codificación son códigos de barras ópticos, tintes fluorescentes u otros medios. Una plataforma ejemplar utiliza mezclas de tintes fluorescentes impregnados en partículas de polímero como medio para identificar a cada miembro de un conjunto de partículas en el que se ha inmovilizado una sonda de captura específica. Otra plataforma ejemplar utiliza códigos de barras holográficos para identificar partículas de vidrio cilíndricas. Por ejemplo, Chandler et al. (Patente de EE.UU. No. 5,981,180) describen un sistema basado en partículas en el que diferentes tipos de partículas están codificadas por mezclas de diversas proporciones de dos o más tintes fluorescentes impregnados en partículas poliméricas. Soini (Patente de EE. UU. No. 5,028,545) describe un sistema de ensayo multiplexado basado en partículas que emplea fluorescencia resuelta en el tiempo para la identificación de partículas. Fulwyler (Patente de EE. UU. No. 4,499,052) describe un método ejemplar para utilizar partículas distinguidas por color y/o tamaño. Publicación de patentes de EE. UU. Nos. 2004-0179267, 2004-0132205, 2004-0130786, 2004-0130761, 2004-0126875, 2004-0125424, y 2004-0075907 describen partículas ejemplares codificadas por códigos de barras holográficos. Patente de EE. UU. No. 6,916,661 describe partículas poliméricas (por ejemplo, micropartículas) que están asociadas con partículas que tienen tintes que proporcionan un código para las partículas.

Como se utiliza en la presente, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que puede causar que el sistema inmune produzca una respuesta de anticuerpos contra ella, y posiblemente pueda desencadenar una reacción biológica cuando un anticuerpo se une a ella en las condiciones in vivo apropiadas. El término antígeno tal como se utiliza en la presente se referirá a una molécula diana completa o un fragmento de dicha molécula reconocida por un sitio de unión al antígeno. Específicamente, las subestructuras de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido, generalmente denominadas "epítopes", que son inmunológicamente relevantes, pueden ser reconocidos por un anticuerpo. En particular, un antígeno de acuerdo con la presente invención es un polipéptido del SARS-CoV-2 tal como se describe en la presente a continuación y normalmente incluye antígenos N y S 1. Por tanto, en algunas realizaciones, el antígeno de la presente invención comprende al menos un epítipo. Los métodos para identificar y caracterizar epítipes son bien conocidos en la técnica. Normalmente, dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, algoritmos de predicción de epítipes y peptidoma asociado al MHC identificado mediante espectrometría de masas (MS).

Como se utilizan en la presente, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los polipéptidos, cuando se discuten en el contexto de la presente invención, se refieren al respectivo polipéptido intacto, o cualquier fragmento o derivado diseñado genéticamente del mismo, el cual conserva la función bioquímica deseada y/o la conformación de la proteína intacta.

En el método anterior, uno del primer y segundo polipéptidos del SARS-CoV-2 deriva de la proteína nucleoproteína (N). En algunas realizaciones no mencionadas en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no son inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, este polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 1.

MSDNGFQONQRNAFRITFGGFS DSTGSSNONGEFSGARSKQRRFPQGLPNNTASWFTALTQHG  
KEDLKFFPGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRFATRRIIRGGDGKMKDLSFRWYFYFLGTGPEAG  
LFGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNEANNAIIVLQLFQSTTLFKGFEYAEGSRGGS  
QASSFSSSRSRNS SRNSTFGSSRGTSSEAFMAGNGGDAALALLLLDRLNQLSKMSGKGGQ  
QQGQTVTKKSAAEASKKFRQKPTATKAYNVTQAFGRFGFEQTQGNFGDQELI PQGTDYKH  
WPQIAQFAPASASAFEGMSEI GMEVTFSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHI DAY  
KTFPPTEPKKDKKKKADETAALPQPQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSADSTQA

SEQ ID NO: 1 >sp | P0DTC9 | NCAP\_SARS2 Nucleoproteína OS= síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 OX = 2697049 GN=N PE = 1 SV = 1

- 5 En el método anterior, el otro del primer y segundo polipéptido del SARS-CoV-2 deriva de la proteína S1. En algunas realizaciones, otro polipéptido del SARS-CoV-2 deriva de la proteína S. En algunas realizaciones, otro polipéptido del SARS-CoV-2 deriva de la proteína S2. En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, el polipéptido del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, el polipéptido del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el residuo de aminoácido en la posición 13 hasta el residuo de aminoácido en la posición 685 en SEQ ID NO:2 ("proteína S1").
- 10 En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, el polipéptido del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el residuo de aminoácido en la posición 686 hasta el residuo de aminoácido en la posición 1273 en SEQ ID NO:2 ("proteína S2").
- 15 En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, el polipéptido del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila desde el residuo de aminoácido en la posición 816 hasta el residuo de aminoácido en la posición 1273 en SEQ ID NO:2 ("proteína S2").
- 20

SEQ ID NO: 2 >sp | P0DTC9 | SPIKE\_SARS2 Glicoproteína de espícula OS = síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 OX = 2697049 GN = S PE = 1 SV = 1

MEVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS  
NVTWFHAIHVSQGTNGTKRFENPVLFPNDGVYFASFEKSNIPGWI FGTTLDKTPQSLLIIV  
NNATNVVIKVCEBQFCNDPFLGVYHKNKNSWMESEFFVYSSANNCTFEYVSQPFMLDLE  
GKQGNFKNLPEFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLFQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT  
LLALHRSYLTFGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPFTEFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK  
CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVREPNITNLCPFGEVENATRFASVYAWNRRKRI SN  
CVADYSVLYNSASFSTFRCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD  
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYFLFRKSNLKFEEFDISTEIQAGSTPC  
NGVEEFNCYFFLQSYGFQPTNGVGYQFYRVVVLSEFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN  
ENFNGLTGTGVLTESNKKFLPFPQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITF  
GTNTPSNQVAVLYQDVNCTEVEVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSY  
ECDIPIGAGICASYQTQTNSEFRARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTI  
SVTPEILPVSMTKTSVDCTMYICSDSTECSNLLIQYGSFCTQLNRALTGLAVEQDKNTQE  
VFAQVQKIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLENKVTLDAGFIKQYGDC  
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAIQIPFAM  
QMAYRFNGIGVTONVLIYENOKLIANQFNSAIGKIQDLSLSTASALGKLDVVNQNQAQALN  
TLVKQLSSNFGAISVLDILSRIDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTOQLIRAAEIRA  
SANLAATKMSECVLGGSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGTVVFLHVTYVFAQEKNFTTAFA  
ICHGDKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTEVSGNCDVVI GIVNNTVYDF  
LQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL  
QELGSEYEQYIKWPWYIWLGFITAGLIAIVMVPIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDD  
SEFVLKGVKLSHTT

25

En algunas realizaciones, el polipéptido SARS-CoV-2 deriva de la proteasa tipo papaína. En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en

cuestión reivindicado, el polipéptido del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, no mencionadas como tales en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, el polipéptido c del SARS-CoV-2 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que oscila del residuo de aminoácido en la posición 746 hasta el residuo de aminoácido en la posición 1060 en SEQ ID NO:3.

5 SEQ ID NO: 3 >sp | P0DTD1 | R1AB\_SARS2 Proteína replicasa 1ab OS= síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 OX = 2697049 GN = rep PE = 1 SV = 1

MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEVLS EARQH LKDGTCGLVEVEKGV  
 LPQLEQPYVFIKRS DARTAPHGHVMVELVAELEGIQYGRSGETPLGVLVPHVGEI PVAYRK  
 VLLKNGKNGKAGCHSYCADLKSFDLGDDELGTD P YEDFQENWNTRHSSCVTR ELMRELNGC  
 AYTRYVDNNFCGPDGYPLECIKDLLARAGKASCTLSEQLDFI DTRRGVYCCPEHEHEIAW  
 YTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNGECPNFVFP LNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRI  
 RSVYFVASFNECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFVKATCEFCCTENLTKEGATTCGYL  
 PQNAVVKIYCPACHNSEVGF EHS LAEYHNESGLKTI LRKGRRTI AFGGCVFYSYVGSCHNKC  
 AYVWPRASANI GCNHTGVVGESEGLNDNLLEI LQKEKVNINIVGDFKLN E E I A I I L A S F

SASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESCGNFKVTKSKAKKGAWNIGEQKSIILSFLYAFASEA  
 ARVVRSI FSP TLETAQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRLI DAMMPTSDLATNNLVVMAY  
 ITGGVVQLTSQWL TN I FGTVYEK LK FVL DWLEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFI STCACEIV  
 GGQIVTCAKEIKESVQTF FKL VNKFLALCADSI I I GGAKLKALNLGETFVTHSKGLYRKC  
 VKSREETGLLMFLKAPKEIIFLEGETLPTEVLTPEEVVLKTDGLQPLEQPTS EAVEAFLVG  
 TPVCINGLMLEIKDTEKYCALAPNMVNTNNTPTLKGGAFTKVTFGDDTVI EVQGYKSVN  
 ITFELDERI DKVLNEKCSAYTVELGSTEVEFACVVALAVI KTLQPVSELLT PLGIDLDEW  
 SMATYYL FDESGEFKLASHMYCSFYPPDEDEE EGDCEEEEFEPSTQY EYGTEDDYQ GKPL  
 EFGATSAALQPEEEQEEDWLDLDDSQQT VGGQDGS EDNQT TTIQT IVEVQPQLEMELTPVV  
 QTI EVNSFSGYLKLT DNVIKKNADIVEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATN  
 NAMQVESDDYIATNGPLKVGGS CVL SGNLAKHCLHVVGPVNVKGEDIQLLKSAYENFNQ  
 HEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLRVCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQVE  
 QKIAEIPKEEVKPFYTESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVTTTLEETKFLTENLLLYIDIN  
 GNLHFD SATLVSDI DITFLKRDAPYIVGDDVQEGVLTAVVI PTKKAGGTTEMLAKALRKV  
 PTDNYITTYPGQLNGYTVVEAKTVLKKCKSAFYILFSII SNEKQEI LGTVSWNLREMLA  
 HAEETHKLMFVCVETKAI VSTIQPKYKGIKIQEGVVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTLND  
 LNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRS LKVPATVSVSSPDAVTA YNGYLTSSSKTPEEH  
 FIETISLAGSYKDWSSYSGQSTQLGIEFLKRGDKSVYTTSNPTTFHLDGEVI TFDNLKTL L  
 SLFEVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGOQFGPT YLDGADVTKIKPHNSHEGKTFYV  
 LPNDDTLRVEAF EY YHTTDP SFLGRYMSALNHTKWKYPQVNGLTSIKWADNNCYLATAL  
 LT LQQI ELKFNF PALQDAYYFARAGEAANFCALI LAYCNKTVGELGDVRETMSYLFQHAN  
 LDSCKPVLNVVCKTCGQQQTTLKGV EAVMYMGTLSYEQFKKSVQI PCTCGKQATKYLVQQ  
 ESFFVMMSAPPAQYELKHGFTFCASEYTGNYQCGHYKHITSKETFLYCIDGALLTKSSEYK  
 GPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNYKKKDN SYFTEQPI DLVFNQPY  
 PNASFDNFK FVCDNIKFADDLNQLTGYKKFASRELKVTFFPDLNGDVVAI DYKHYPSPFK  
 KGAKLLHKPIVWHVNNA TNKATYKPNFTWCI RCLWSTKPVETSNSFDVLKSEDAQGM DNLA  
 CEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLECNVKTPEVVGDI I LK PANNSLKI TEEVGHPDLMAAYV  
 DNSSLTIKRPNELSRVLGLKTLATHGLAAVNSVFWDTIANYAKPFLNKVVSTTTNIVTFC  
 LNRVCTINM FYFTLLLQLCTFTRSTNSRIKASMTT LAKNTVKSVGKFCLEASFNYLKS  
 PNF SKLINI I I WFLLLSVCLGSLIYSTAALGVLM SNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIAT  
 YCTGSI PCSVCLSGLDSDLTYESLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWFLAYILFTRFFYV

LGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWIMWLIINLVQMAFISAMVRMYIFFASFYVWKS YVHV  
 VDCNSSTCMMCYKENRATVECTTI VNGVRRS FYVYANGGKGFCKLHNWNCVNCDTFCA  
 GSTFI SDEVAPDLSLQFKRPINPTDQSSYIVDSVTVKNGSITHLYFDKAGQRTYBRHSLSH  
 FVNLDNLRANNYKESLFINVI VFDGKSKCEESSAESASVYYSQLMCQPI LLLLDQALVSDV  
 GDSAEVAVKMF DAYVNTFSSTFNVPMEK LKT LVATAEAEALAKNVSLDNVLS TFI SAARQG  
 FVDS DVETKDVVECLKLSHQSDIEVTGDS CNMYMLTYNKVENMTPRDLGACIDCSARHIN

AQVAKSHNIALIWNVVKDFMSLSEQLRKQIRSAAKNNLPFKLTCATPROVVNVVTTKIAL  
 KGGKI VNNWLKQLIKVTLVFLFVAAI FYLITPVHVMKHTDFSSSEI IGYKAI DGGVTFDI  
 ASTDTCFANKHADEFDTWFSQRGGSYTNDAKACPLIAAVITREVGFFVPGLPFTI LRRTNGD  
 FLHFLFRVFSAVGNI CYTPSKLIEYTDFAVSACVLAECTIFKSDASGKFPVFCYDNTVLE  
 GSVAYESLRFDFTRYVLMGDSIIQFPNTYLEGSSVRVVTTFDSEYCFHGTCERSEAGVCVST  
 SGRWVLLNNDYYRSLPGVFCGVDVAVNLLTNMFTPLIQPI GALLI SASIVAGGIVAVVVTCL  
 AYYEMRFRRAFGEYSHVVAFWNTLLFLMSFTVLCLTFVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTNDV  
 SFLAHIQWVMVMTPLVFPFWIT IAYI ICI STKHFWFFSNYLKRFVVFNGVSPSTFEEAAL  
 CTFLLNKEMYLKLPSDVLPLTQYNYLALYNKYKYFSGAMDFTSYPEAACCHLAKALND  
 FSNSSGSDVLYQPPQTS IPTSAVLQSGFFKMAFFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDVYV  
 CPRHVICTSEDMLNPNYEDLLI RKSNNHFLVQAGNVQLRVI GHSMQNCVLLKLVDTANPK  
 TPKYKFVRIQPGQTPSVLACYNGSPSGVYQCAMPBNFTIKGSPNGSSCGSVGFNI DYDCV  
 SFCYMHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDR  
 WFLNRETTTTLNDENLVAMKYNYPETQDHVDELGFLSAQTGLAVLDMCASLKE LLONGMN  
 GRTI LGSALLEDEFTPPFDVVPQCSGVTFCQSAVKRTIKGTHHWL LTTI LTLVLVQSTQW  
 SLFFFLYENAFLEFAMGI IAMSAAFAMMFVKKHAFCLCLFLLESLATVAYENMVMPASWV  
 MRIMPWLDMDVPSLSGFKLKDVCVMYASAVVLLI LMEARTVYDDGARRVWTL MNVLTFLVYK  
 VYYGNALDQALSMWALI I SVTSNYSGVVTVMELARGI VEMCVEYCPLEFFITGNTLQCIM  
 LVYCFGLGYFCTCYFGLFCLLNRYFRLTLGVYDYLVSTQEFYMNSSQGLLEPKNSI DAFKL  
 NIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLLSVLQQLRVESSSKLWAQCQVQLHNDILL  
 AKDTPTEAFEKMSVLLSVLLSMQGAVDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSSLP SYAAFATA  
 QEAYEQAVANGDSEVVLKKLKKS LNVAKSEFDRDAAMQRKLEKMDQAMTQMYKQARSED  
 KPAKVTSAMQTM LFTMLRKLNDALNNI INNARDGCVPLNI I PLTTAAKLMVVI PDYNTY  
 KNTCDGTTFTYASALWEIQQVVDADSKI VQLSEI SMDNSPNLAWPLI VTALFANS AVKLQ

NNELSFVALRQMSCAAGTTQTACTDDNALAYYNTTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSD  
 GTGTIYTELEPPCFEVDTPKGPVKYLYFTIKGLNLRGMVLSLAATVRLQAGNATEV  
 PANSTVLSFCFAFVDAKAYKDYLAGGGQFITNCVKMLCTHTPGTQAI TVTPEANMDQES  
 FGGASOCLYCRCHI DHPNFKGFCDLKGYVQI PPTCANDPVGFTLENTVCTVCGMWKGYG  
 CSCDQLREPMLOSADAQSF LN RVCGVSAARLT PCGTGTSTDVYRAFDTIYNDKVAGEAKE  
 LKTNCCRFQEKDEDDNLI DSYFVVKRHTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFKFRIDG  
 DMVPHISRQRLTKYTMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWDYDFVEN  
 PDI LRVYANLGERVRQALLKTVQFC DAMRNAGI VSVLTLDNQDLNGNWDYDFGDFIQTTPG  
 SGVPVVDSSYSLMFI LTLTRALTAESHVDTDLTKFYIKWDLKDYDFTEERLKLFDRYFK  
 YWDQTYHPNCVNCLEDDRCI LHCANFNVL FSTVFPPTSFSGFLVRKI FVDGVPFVSTGYHF  
 FELGVVHNQDVNLHSSFLSKELLYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNVAFQ  
 TVKPGFNFKDFYDFAVSKGFFKEGSSVELKHEFFAQDGNAAI SDYDYFYFNLP TMCDIRQ  
 LLFVVEVVDKYFDCYOGGCINANQVI VNNLDKSAAGFPFNKWKARLYYDMSYEDQDALF  
 AYTKRNVIP TITQMNLYAI SAKNPARTVAGVSI CSTMTNRQPHQKLLKSI AATRGATVV  
 IGTSKFYGGWHNMLKTVYSDVENPHLMGWDPKCDPAMPNMLPIMASLVLARKHTTCCSL  
 SHRFYELANCAQVLSMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTANVNALL  
 STDGNKIADKYVRNLQHRLYECLYRNRDVTDFVNEFYAYLRKHFSMMI LSDDAVVCFNS  
 TYASQGLVASIKNFKSVLYYQNNVFMSEAKCWTEFDITKGPHEFCSQHTMLVKQGDYVY  
 LPYDPDSRI LGAGCFVDDIVKTDGTLMI ERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVPHLYLQYI  
 RKLHDELGTGHMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMYPHTVLQAVGACVLCNSQTS LRC  
 GACIRRFLLCKCCYDHVISTSHKLVLSVNFYVCNAPGCDVTDVTQLYLGGMSYCKSHK  
 PPI SFPLCANGQVFGLYKNTCVGSDNVTDFENAIATCDWTNAGDYI LANTCTERLKLFAAE  
 TLKATEETFKLSYGIATVREVLS DRELHLSWEVGRPRPPLNPNYVFTGYRVTKNSKVQIG  
 EYTFEKGDYGDVVYRSTTTYKLVNGDYFVLTSHVTMPLSAPTLLVFOHEHYVRI TGLYPTL  
 NISDEFSSNVANYQKVGMMQKYSTLQGPFGTGKSHFAIGLALYPSARI VYTACSHA AVDA  
 LCEKALKYLFIDKCSRI I PARARVECFDKFKVNSTLEQYVFTVNALFETTADIVVFEI  
 SMATNYDLSVNNARLEAKHYVYIGDFAQLFAPRTLLTKGTLEPEYFNSVCRMLMTIGPDM  
 FLGTCRRCPAEIVDFTVSALVYDNK LKAHKDKSAQCCKMFYKGVITHDVS SAINRFQIGVV

REFLTRNEAWPKAVFISFYNSQNAVASKILGLPTQTVDSSQGSEYDYVI FTQPTTETAHSC  
 NVNRENVAITRAKVGILCIMS DRDLYDKLQFTSLEI FRRNVATLQAENV TGLFKDCSKVI  
 TGLHPTQAPTHLSVDTKFKTEGLCVDI PGIPKDMTYRRLI SMMGFKMNYQVNGYFNMFIT  
 FEEAIRHVRAWIGFDVEGCHATREAVGTNLEFLQLGFSTGVNLVAVPTGYVDTFNNTDFSR  
 VSAKPPPGDQFKHLI PLMYKGLPWNVVRIKIVQMLS DTLK NLS DRVVFV LWAHGFELTSM  
 KYFVKIGPERTCCLCDBRATCFSTASDTYACWHHSIGFDYVYNPFMIDVQQWGF TGNLQS  
 NHDLYCQVHGNHAVASCDAIMTRCLAVHECFVKFVDWTIEYPLIGDELKINAACRKVQHM  
 VVKAALLADKFFVLHDI GNPKAIKCVPQADVEWKFYDAQPCSDKAYKIEELFYSYATHSD  
 KFTDGVCLFWNCNVDRYPANSIVCRFDTEVLSNLNLP GCDGGS LYVNNKHAFTPAFDKSA  
 FVNLKQLPFFYYSDSPCESHGKQVVS DIDIYVPLKSATCITR CNLGGAVCRHHANEYRLYL  
 DAYNMMI SAGFSLWVYKQFDTYNLWNTFTRLQSL ENVAFNVVNKGHFDDGQQGEVFSI IN  
 NTVYTKVDGVDVELFENKTTLPVNVAFELWAKRNI KFPVEVKI LNNLGV DIAANTVIW DY  
 KRDA PAHISTIGVCSMTDIAKKSTETICAPLTVFEDGFEVDGQVDFLFPNARNGVLI TEGSV  
 KGLQPSVGFKQASLNFVTLIG EAVKTQFNYYKFNVDG VVQQLPETYFTQSRNLQEFKPRSQ  
 MEIDFLELAMDEFIERYKLEGYAFEBHIVYGDFSHS QLGGLHLLI GLAKRPFKESFFELEDF  
 IPMDSTVKNYFITDAQTGSSKCVCSVIL D LLLD DFEV I IKSQDLSVSVKVVKVTIDYTEI S  
 FMLWCKDGHVETFFYFKLQSSQAWQP G VAMPNLYKMQRMLLEKCDLQNYGDSATLPKGIMM  
 NVAKYTQLCQYLNTPLFLAVPYNM RVI HFGAGSDKGVAPGTAVLRQWLFTGTLIVDS DLND  
 FVSDADSTLIGDCATVHTANKWDLI ISDMYDPKTKNVTKENDSKEGFFTYICGFIQQKLA  
 LGGSVAIKITEHSWNADLYKLMGHFAWNTAFVTNVNASSSEAF LIGCNYLGKPREQIDGY  
 VMHANYIFWRNTNPIQLSSYSLFDMSKFFLKL RCTAVMSLKEGQINDMILSLLSKGRLLI  
 RENNEFVVISSDVLVNN

5 En el presente texto, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con una segunda  
 secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 o 100% de  
 identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos  
 del porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos  
 secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios  
 programas y algoritmos de alineamientos se describen en: Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981;  
 Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 85:2444,  
 10 1988; Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153, 1989; Corpet et al. Nuc.  
 Acids Res., 16:10881-10890, 1988; Huang et al., Comp. Appls Biosci., 8:155-165, 1992; and Pearson et al., Meth. Mol.  
 Biol., 24:307-31, 1994). Altschul et al., Nat. Genet., 6:119-129, 1994, presenta una consideración detallada de los  
 métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología. A modo de ejemplo, las herramientas de  
 15 alineamiento ALIGN (Myers and Miller, CABIOS 4:11-17, 1989) o LFASTA (Pearson and Lipman, 1988) pueden  
 utilizarse para realizar comparaciones de secuencias (Internet Program® 1996, W.R. Pearson and The University of  
 Virginia, fasta20u63 versión 2.0u63, fecha de lanzamiento diciembre de 1996). ALIGN compara secuencias completas  
 entre sí, mientras que LFASTA compara regiones de similitud local. Estas herramientas de alineamiento y sus  
 respectivos tutoriales están disponibles en Internet en el sitio web de NCSA, por ejemplo. Alternativamente, para  
 20 comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de alrededor de 30 aminoácidos, se puede emplear la función  
 de secuencias Blast 2 utilizando la matriz predeterminada BLOSUM62 configurada con parámetros predeterminados  
 (coste de existencia de hueco de 11 y un coste de hueco por residuo de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (menos  
 de alrededor de 30 aminoácidos), el alineamiento debe realizarse utilizando la función de secuencias Blast 2,  
 empleando la matriz PAM30 configurada con los parámetros predeterminados (hueco abierto 9, penalizaciones de  
 extensión de hueco 1). El sistema de comparación de secuencias BLAST está disponible, por ejemplo, en el sitio web  
 25 del NCBI; véase también Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990; Gish. & States, Nature Genet., 3:266-272,  
 1993; Madden et al. Meth. Enzymol., 266:131-141, 1996; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997; and  
 Zhang & Madden, Genome Res., 7:649-656, 1997.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido de SARS-CoV-2 se une a la superficie de la partícula mediante cualquier  
 método convencional bien conocido en la técnica, tal como se describe en Hermanson, Greg T. Bioconjugate  
 techniques. Academic press, 2013. En algunas realizaciones, se utilizan reacciones de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]  
 clorhidrato de carbodiimida (EDC)-N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo NHS) para conjugar los polipéptidos coronavirusales  
 a las partículas. En algunas realizaciones, la partícula está conjugada con una fracción de avidina que puede crear un  
 complejo de avidina-biotina con los polipéptidos coronavirusales biotinilados y las partículas. Adicionalmente, los agentes  
 que entrecruzan apropiados para uso en la invención incluyen una variedad de agentes que son capaces de reaccionar  
 35 con un grupo funcional presente en una superficie de la partícula. Los reactivos capaces de tal reactividad incluyen  
 reactivos homo- y hetero-bifuncionales, muchos de los cuales son conocidos en la técnica. Se prefieren los reactivos  
 hetero-bifuncionales. Un agente que entrecruza típico bifuncional es N-succinimidilo (4-yodoacetilo) aminobenzoato  
 (SIAB). Sin embargo, otros agentes que entrecruzan, incluyen, sin limitación, dimaleimida, ácido ditio-bis-nitrobenzoico

(DTNB), N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidilo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y 6-hidrazinonicotimida (HYNIC) también pueden utilizarse. Para más ejemplos de reactivos que entrecruzan, véase, por ejemplo, S. S. Wong "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking," CRC Press (1991), and G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques," Academic Press (1995).

- 5 En algunas realizaciones, el receptáculo puede ser cualquier recipiente sólido, por ejemplo, un tubo de ensayo, un pocillo de microplaca o una cubeta de reacción hecha de polipropileno.

En algunas realizaciones, la eliminación de los reactivos no unidos se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, tal y como, por ejemplo, lavado mediante pasos repetidos de centrifugación.

- 10 Como se utiliza en la presente el término "inmunocomplejo" se refiere al complejo formado entre los anticuerpos específicos para el coronavirus del sujeto y su antígeno específico, es decir, el polipéptido coronaviral que está conjugado a la partícula.

- 15 La presencia y cantidad de los inmunocomplejos se pueden detectar mediante métodos conocidos en la técnica, incluida la detección basada en marcadores y libre de marcadores. En algunas realizaciones, el método de la presente invención incluye el uso de un anticuerpo secundario que está acoplado a un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señales. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario tiene especificidad por una inmunoglobulina en particular. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo IgG anti-humano, que incluye los anticuerpos anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-IgM. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo IgA anti-humano, incluidos los anticuerpos anti-IgA1 e IgA2. En algunas realizaciones, el anticuerpo que tiene especificidad por un tipo particular de inmunoglobulina es un anticuerpo de conejo o de cabra. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Por tanto, en algunas realizaciones, el método de la presente invención es particularmente adecuado para detectar la presencia de los anticuerpos IgM específicos para SARS-CoV-2. El método de la presente invención es particularmente adecuado para detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos para SARS-CoV-2. En algunas realizaciones, el método de la presente invención también es particularmente adecuado para detectar la presencia de anticuerpos IgA específicos para SARS-CoV-2. En algunas realizaciones, el método de la presente invención es particularmente adecuado para detectar la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos para SARS-CoV-2. Los reactivos indicadores incluyen agentes cromogénicos, catalizadores como conjugados enzimáticos, compuestos fluorescentes tal como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcadores visuales directos, así como cofactores, inhibidores y partículas magnéticas. Ejemplos de conjugados enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y beta-galactosidasa. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario está conjugado a ficoeritrina.
- 20
- 25
- 30

- 35 Los métodos para detectar los códigos de identidad de partículas, por ejemplo, un código fluorescente, son conocidos en la técnica y se describen a continuación. Ejemplos de sistemas que leen (detectan o analizan) señales de ensayo multiplex de perlas Luminex incluyen, por ejemplo, los instrumentos Luminex xMAP 100 y xMAP 200 o el Bio-Plex 100 y Bio-Plex 200 de BioRad Instruments. Otro método para detectar y/o separar conjuntos de partículas basándose en códigos ID es la citometría de flujo. Los métodos de y la instrumentación para la citometría de flujo se conocen en la técnica, y aquellos que se conocen pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. La citometría de flujo, en general, involucra el paso de una suspensión de partículas como una corriente a través de un haz de luz y sensores electroópticos, de tal manera que solo una partícula a la vez pasa a través de la región. A medida que cada partícula pasa por esta región, el haz de luz se ve perturbado por la presencia de la partícula y se detecta la luz dispersada y fluorescente resultante. La instrumentación utiliza las señales ópticas para identificar el subgrupo al cual pertenece cada partícula, junto con la presencia y cantidad de marcador, de modo que se logren resultados de ensayo individuales. Las descripciones de instrumentación y métodos para citometría de flujo se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh et al., "Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K. D., et al., eds. (Baltimore, Md., USA: Williams and Williams, 1993), pp 535-544; Lindmo et al., "Immunometric Assay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity," *J. Immunol. Meth.* 126: 183-189 (1990); McHugh, "Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays," *Immunochemica* 5: 116 (1991); Horan et al., "Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry," *Immunoassays in the Clinical Laboratory*, 185-189 (Liss 1979); Wilson et al., "A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry," *J. Immunol. Meth.* 107: 225-230 (1988); Fulwyler et al., "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Meth. Cell Biol.* 33: 613-629 (1990); Coulter Electronics Inc., Patente del Reino Unido No. 1,561,042 (publicada el 13 de febrero de 1980) y Steinkamp et al., *Review of Scientific Instruments* 44(9): 1301-1310 (1973).
- 40
- 45
- 50
- 55

- 60 Típicamente, el paso de detección implicaba así el uso de un detector. Como se utiliza en la presente, el término "detector" pretende referirse a un dispositivo o aparato que convierte la energía de los fotones en contacto en una respuesta eléctrica. Por ejemplo, el término puede incluir un aparato que produce una corriente eléctrica en respuesta a fotones impactando, tal como en un fotodiodo o un tubo fotomultiplicador. Un detector también puede acumular carga en respuesta a fotones incidentes y puede incluir, por ejemplo, un dispositivo de carga acoplado. En particular, el

5 detector implica el uso de una fuente de radiación. Como se utiliza en la presente, el término "fuente de radiación" pretende referirse a un origen o generador de energía electromagnética propagada. El término puede incluir cualquier fuente de iluminación incluidas, por ejemplo, aquellas que producen radiación electromagnética en las regiones ultravioleta, visible y/o infrarroja del espectro. Una fuente de radiación puede incluir, por ejemplo, una lámpara tal como una lámpara de arco o una lámpara halógena de cuarzo, o un láser. Tal como se utiliza en la presente, el término "láser" pretende referirse a una fuente de radiación producida por amplificación de la luz mediante emisión estimulada de radiación. El término puede incluir, por ejemplo, un láser de iones tal como de iones de argón o láser de iones de criptón, láser de helio neón, láser de helio cadmio, láser de colorante tal como láser de rodamina 6G, láser YAG o láser de diodo. Estos y otros láseres útiles en el aparato de la invención son conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Shapiro, Practical Flow Cytometry, 3rd Ed. Wiley-Liss, New York (1995).

10 En algunas realizaciones, el detector es un citómetro de flujo. Como se utiliza en la presente, el término "citómetro de flujo" pretende significar un dispositivo o aparato que tiene un medio para alinear las partículas en una corriente de muestra y un detector alineado de manera que las partículas entren individualmente en una zona de detección. Una corriente de muestra puede incluir cualquier fase móvil que pase partículas en una sola fila, incluyendo, por ejemplo, una corriente de fluido o un chorro de fluido.

15 El método de la presente invención implica el uso de una tecnología múltiplex. La tecnología multiplex es el término colectivo para una variedad de técnicas que pueden evaluar múltiples especificidades de inmunoglobulinas simultáneamente en pequeños volúmenes de muestra. La ventaja de la tecnología multiplex es que es capaz de proporcionar tiempos de prueba muy rápidos y un rendimiento de muestras muy alto.

20 En algunas realizaciones, los grupos de partículas utilizados en el paso a) del método anterior difieren entre sí por sus códigos de identidad (por ejemplo, fluoróforos).

25 El método de la presente invención es particularmente adecuado para detectar simultáneamente inmunoglobulinas que tienen especificidad por la nucleoproteína (N) de SARS-Cov-2 y la proteína S 1 de SARS-Cov-2. La detección de la proteína de espícula (S) (incluido un fragmento del mismo tal como fragmentos S2 o S2') y/o la proteinasa tipo papaína (PL-Pro) no se mencionan en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no son inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado. Por tanto, el método de la presente invención comprende el paso de poner en contacto la muestra con al menos 2 grupos de partículas, estando cada partícula conjugada con un antígeno de SARS-Cov-2 particular. De acuerdo con la invención, la muestra se pone en contacto con una pluralidad de partículas, en el que un polipéptido que deriva de la proteína N está unido a la superficie de algunas partículas y en el que un polipéptido que deriva de la proteína S 1 está unido a la superficie de otras partículas. En algunas realizaciones no mencionadas en las reivindicaciones de esta patente, pero aun así no son inconsistentes con el tema en cuestión reivindicado, la muestra también se pone en contacto con partículas en las que un polipéptido derivado de la proteína PL-Pro está unido a la superficie.

35 En algunas realizaciones, el método de la presente invención implica un inmunoensayo con perlas láser direccionables (ALBIA), que está disponible comercialmente en Plataformas basadas en -Luminex™. Por ejemplo, ALBIA es un inmunoensayo de micropartículas semi-cuantitativo homogéneo basado en fluorescencia que se puede utilizar para la detección simultánea de varias inmunoglobulinas (por ejemplo, hasta 10 inmunoglobulinas). Cada antígeno (es decir, polipéptidos N, S1, S2, S2' y/o PL-Pro SARS-CoV-2) está acoplado covalentemente a un conjunto de partículas codificadas por colores de tamaño uniforme distinto. Luego, la muestra se incuba con las partículas en el receptáculo de ensayo único. Luego, las partículas se lavan y luego se incuban con anticuerpos secundarios IgG o IgM anti-humano conjugados con un marcador fluorescente (por ejemplo, ficoeritrina). Después de lavarlas nuevamente, las partículas se analizan en un sistema en el que láseres separados identificaron el antígeno por el color de la perla y cuantificaron el anticuerpo midiendo la fluorescencia de la etiqueta fluorescente. Dicha cuantificación indicó así el nivel de las inmunoglobulinas detectadas.

45 El método de la presente invención es particularmente adecuado para el diagnóstico de la infección por coronavirus. Tal como se utiliza en la presente, el término "diagnosticando" o "diagnóstico", como se utiliza en la presente, significa identificar la infección por coronavirus. En particular, el método de la presente invención es particularmente adecuado para el diagnóstico del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS). El método de la presente invención es adecuado para el diagnóstico de COVID-19.

50 En particular, el método de la presente invención es particularmente adecuado para discriminar sujetos que han sido infectados recientemente por el SARS-CoV-2 de aquellos que ya están inmunizados. Las inmunoglobulinas IgM son los primeros anticuerpos que se producen en el cuerpo en respuesta a una infección. Las inmunoglobulinas IgM son más grandes que las inmunoglobulinas IgG y cuando están presentes en cantidades elevadas, pueden indicar una infección activa reciente o nueva. En resumen, una IgM positiva puede ser un signo de una infección actual o muy reciente. Por el contrario, la presencia de anticuerpos específicos IgG para SARS-CoV-2 indica que el sujeto está inmunizado. Por tanto, el método, al permitir la detección de anticuerpos IgM, IgG y/o IgA específicos para SARS-CoV-2, proporciona un método asistido de detección rápido, sencillo y preciso para identificar pacientes infectados, en particular pacientes COVID-19.

El método de la presente invención también es particularmente adecuado para el seguimiento serológico y el control terapéutico de infecciones por SARS-CoV-2, en particular COVID-19. En algunas realizaciones, el método de la presente invención es particularmente útil con fines de vacuna.

- 5 Tal como se utiliza en la presente, el término "vacuna" incluye al menos un antígeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmune en un hospedero. Las composiciones de vacuna se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médicas o veterinarias, teniendo en consideración factores tales como edad, sexo, peso, especie y condición del animal receptor y la vía de administración. El término "candidato a vacuna" se refiere a una vacuna que está en desarrollo (por ejemplo, pruebas preclínicas o ensayos clínicos).
- 10 En particular, el método se puede llevar a cabo para determinar si un sujeto logra una protección con una vacuna o un candidato a vacuna que comprende i) detectar mediante la realización del método de la presente invención la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 (en particular anticuerpos IgG específicos para SARS-CoV-2) ii) y concluir que el sujeto logra una protección con la vacuna o candidato vacunal cuando se detecta la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2.
- 15 El método de la presente invención también es adecuado para determinar si un sujeto tiene que ser vacunado contra SARS-CoV-2, comprendiendo dicho método i) detectar mediante la realización del método de la presente invención la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 (en particular anticuerpos IgG específicos para SARS-CoV-2) ii) y concluir que el sujeto tiene que ser vacunado cuando se detecta la ausencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 o por el contrario no necesita ser vacunado si se detecta la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2.
- 20

El método de la presente invención también ofrece a los médicos una herramienta fiable para fines de investigación (por ejemplo, seleccionar una vacuna candidata, evaluar una terapia, estudiar la replicación del virus o estudios epidemiológicos). El método de la presente invención también es adecuado para decidir medidas de contención o descontención para un individuo, o para un grupo de individuos.

- 25 El método también es particularmente adecuado para tomar las decisiones clínicas más precisas. En particular, la detección de anticuerpos IgG específicos para SARS-CoV-2 puede hacer que el sujeto sea elegible para un tratamiento inmunosupresor. Tal como se utiliza en la presente, el término "tratamiento inmunosupresor" se refiere a cualquier sustancia capaz de producir un efecto inmunosupresor, por ejemplo, la prevención o disminución de la respuesta inmune y en particular la prevención o disminución de las respuestas inflamatorias agudas. En algunas realizaciones,
- 30 el método de la presente invención es particularmente adecuado para determinar si un sujeto es elegible para una terapia con un corticosteroide. Como se utiliza, el término "corticosteroides" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una clase de ingredientes activos que tienen un sistema de anillo de cicloperhidrofenantreno hidrogenado dotado con una actividad antiinflamatoria. Los fármacos corticosteroides suelen incluir cortisona, cortisol, hidrocortisona (11 $\beta$ ,17-dihidroxi, 21-(fosfonooxi)-pregn-4-eno, 3,20-diona disódica), dihidroxicortisona, dexametasona (21-(acetiloxi)-9-fluoro-1 $\beta$ ,17-dihidroxi-16 $\alpha$ -m-etilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) y fármacos esteroides altamente derivatizados como beconasa (dipropionato de beclometasona, que es 9-cloro-11- $\beta$ , 17,21, trihidroxi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4 dieno-3,20-diona 17,21-dipropionato). Otros ejemplos de corticosteroides incluyen flunisolida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, deflazacort y betametasona. corticosteroides, por ejemplo, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, betametasona, dipropionato de beclometasona,
- 35 (21-(acetiloxi)-9-fluoro-1 $\beta$ ,17-dihidroxi-16 $\alpha$ -m-etilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) y fármacos esteroides altamente derivatizados como beconasa (dipropionato de beclometasona, que es 9-cloro-11- $\beta$ , 17,21, trihidroxi-16 $\beta$ -metilpregna-1,4 dieno-3,20-diona 17,21-dipropionato). Otros ejemplos de corticosteroides incluyen flunisolida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, deflazacort y betametasona. corticosteroides, por ejemplo, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, betametasona, dipropionato de beclometasona,
- 40 budesonida, fosfato sódico dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, acetónido de triamcinolona, betametasona, flucinolona, flucinonida, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, desonida, desoximetasona, flucinolona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, propionato de clobetasol y dexametasona.

- Otro objetivo adicional de la presente invención se refiere a un kit para realizar el método de la presente invención. El kit comprende una o más pluralidades de partículas como se describió anteriormente y medios para determinar los inmunocomplejos. También se pueden proporcionar reactivos para tipos particulares de ensayos en kits de la invención. Por lo tanto, los kits pueden incluir diferentes grupos de partículas, cada una de ellas identificada por una identidad específica, placas que comprenden receptáculos de ensayo únicos (por ejemplo, una placa multi pocillo) y anticuerpos secundarios como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, los kits comprenden un dispositivo como un detector como se describe anteriormente. Los grupos de partículas, la placa y los dispositivos son
- 45 útiles para realizar el inmunoensayo de la presente invención. Además, los kits pueden incluir varios diluyentes y tampones, conjugados marcados u otros agentes para la detección de inmunocomplejos específicos y otros reactivos generadores de señales, como sustratos enzimáticos, cofactores y cromógenos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente otros componentes de un kit.
- 50

- La invención se va a ilustrar mejor mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitativos del alcance de la presente invención.
- 55

Figuras:

Figura 1. Detección, titulación y reactividad cruzada de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 Espícula S1, IgG proteína de nucleocápside N y anticuerpos IgM anti-SARS-CoV-2 Espícula S1 mediante ALBIA-IgG-S1/N y ALBIA-IgM-S1.

(A) Se obtuvo una curva de calibración después de diluciones en serie del calibrador, es decir, una muestra altamente positiva. Se alcanzó una meseta de intensidad de fluorescencia media (MFI) para diluciones 1:400 o inferiores.

5 (B) Cálculo de la titulación de anticuerpos con referencia al valor de MFI del calibrador (barra rayada) utilizado en una dilución de 1/400 en el ensayo y su nivel establecido arbitrariamente en 100 unidades arbitrarias (AU)/ml. El ensayo se realizó primero utilizando una dilución de cribado del suero 1/100. En caso de que la MFI de la muestra en una dilución 1/100 sea superior al 70% de la MFI del calibrador, se realizan diluciones adicionales y la primera dilución que produce una MFI inferior al 70% de la MFI del calibrador se conserva para el cálculo. Se proporciona un ejemplo: en una dilución 1/100, la MFI fue superior al 70% de la MFI del calibrador ( $23,311 \times 0.7 = 16,318$ ), lo que requirió una dilución 1/800 para calcular la titulación, es decir, nivel de IgG 94 AU/ml anti-S 1.

10 (C-E) Especificidad hacia pacientes no COVID-19: reactividad de anticuerpos (C) anti-Espícula S1 y (C) IgG, IgM anti-N y (E) IgM anti-Espícula S1 en pacientes con diferentes afecciones: Infección confirmada por PCR- con otros CoV (17 sueros de 13 pacientes; HKU1, n = 3; OC43, n = 11; NL63, n = 3). RA, artritis reumatoide; SS, síndrome de Sjögren; ASS, síndrome antisintetasa; SLE, lupus eritematoso sistémico.

15 (F-H) Repetibilidad de (F) ALBIA-IgG-S1, (G) ALBIA-IgG-N, (H) ALBIA-IgM-S1. El ensayo se realizó 30 veces en la misma muestra, es decir, un suero de un paciente PCR+ a Covid-19 utilizado en una dilución de trabajo alta de 1/100. Las barras horizontales representan la media y la desviación estándar.

Figura 2. Respuesta de anticuerpos para SARS-CoV-2 el día > 13 post infección.

20 (A) IgG Anti-S1 (mediana = 276 AU/ml), (B) IgG Anti-N (mediana = 1,434 AU/ml), (C) Nivel de IgM Anti-S1 (mediana = 48 AU/ml). Los números entre paréntesis indican los porcentajes de datos por encima y por debajo del umbral. (D-F) Curva de características operativas del receptor (ROC) de ALBIA-IgG-S 1, ALBIA-IgG-N y ALBIA-S 1-IgM. La línea de puntos indica el valor umbral de la 'media C 3 desviaciones estándar (M C 3SD)' del control de la distribución. D, día post síntomas. Se: Sensibilidad y Sp: especificidad.

Figura 3. Niveles de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en diferentes tiempos después del inicio de los síntomas.

25 (A) Nivel de IgG anti-S 1 (mediana = 6 AU/ml y 13 AU/ml para el día < 7 y los días 7-13, respectivamente). (B) Nivel de IgG anti-N (mediana = 11 AU/ml y 60 AU/ml para el día < 7 y los días 7-13, respectivamente). (C) Nivel de IgM anti-S 1 (mediana = 3 AU/ml y 23 AU/ml para el día < 7 y los días 7-13, respectivamente). Los números entre paréntesis indican los porcentajes de datos por encima y por debajo del umbral. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (prueba de Mann-Whitney).

Ejemplo:

Material y métodos

30 Muestras de suero

35 Este es un estudio retrospectivo de muestras de suero procedentes de biodepositos de tres hospitales universitarios franceses autorizados por el Ministerio de Investigación francés para la recolecta, análisis, almacenamiento y reutilización: Hospital Universitario de Rouen (autorización AC 2008-87), Hospital Universitario de Limoges (CRBioLim, autorización DC 2008-604) y Hospital Universitario de Estrasburgo (autorización DC 2010-2222). Los 192 sueros analizados, recolectados entre el 23 de marzo y el 30 de abril, procedían de pacientes hospitalizados o ambulatorios que habían sido positivos confirmados por laboratorio para SARS-CoV-2 mediante RT-PCR de muestras de hisopados faríngeos. De estos 192 pacientes, 18 fueron hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos por una forma grave de la enfermedad.

40 Se recolectaron sueros de control de 300 donadores de sangre sanos (Etablissement Français du Sang, Lille, Francia), 13 pacientes con infecciones confirmadas por PCR por otros coronavirus humanos (17 sueros: HKU1, n = 3; OC43, n = 11; NL63, n = 3), y 70 pacientes con diferentes enfermedades inflamatorias/autoinmunes de acuerdo con criterios de clasificación establecidos: Criterios revisados del Colegio Americano de Reumatología para el lupus eritematoso sistémico (SLE) (Tan et al., 1982) con aAbs anti-ADNs (n = 12), criterios de la Asociación Americana de Reumatismo para la artritis reumatoide (RA) (Arnett et al., 1988) con Abs anti-CCP y/o factor reumatoide (n = 23), criterios Europeos revisados para el síndrome de Sjögren (SS) primario (Vitali et al., 2002) con aAbs anti-SSA y/o anti-SSB (n = 14) y criterios de Troyanov para el síndrome antisintetasa (ASS) (Troyanov et al., 2005) (n = 21). Todas las muestras de suero se almacenaron a -80°C hasta su uso. El manejo de las muestras de suero se realizó en un laboratorio BSL-2.

Proteínas recombinantes

50 La subunidad 1 de Espícula recombinante etiquetada con polihistidina (S1, referencia 40591-V08H) y la proteína de nucleocápside (N, referencia 40588-V08B) se obtuvieron de Sino Biologicals (Beijing, China). La identidad y pureza de estas proteínas recombinantes se determinó primero mediante electroforesis en gel de poliácridamida (SDS-PAGE) con gradiente de 4 a 10% de dodecilsulfato de sodio bajo condiciones no-reductoras, seguido de tinción con azul de Coomassie. El análisis de Western blot se realizó además mediante la transferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE no-reductor a una membrana de nitrocelulosa, seguido de incubación con Ab monoclonal anti-6 x histidina

(Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) y revelación con el correspondiente Ab secundario acoplado a Alexa Fluor 680 (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia)

Inmunoensayo multiplex de perlas láser direccionable (ALBIA) para la detección y cuantificación simultánea de IgG anti-S1 y Anti-N en pacientes COVID-19 (ALBIA-IgG-S1/N)

5 Para detectar simultáneamente IgG anti-S1 y anti-N de una sola muestra, utilizamos dos tipos de perlas con una firma espectral específica. Los códigos de color de las perlas acopladas a -S 1 y -N se numeraron 26 y 55 (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), respectivamente; se acoplaron 10 mg de proteínas recombinantes a  $1.25 \times 10^6$  microesferas de COOH- Bio-Plex<sup>R</sup> fluorescentes (Bio-Rad) con el kit de acoplamiento de aminas Bio-Plex<sup>R</sup> (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después del acoplamiento, las perlas recubiertas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C en la oscuridad. La eficacia del acoplamiento se validó utilizando un Ab comercial que reconoce la etiqueta de polihistidina (Sigma), seguido de un Ab secundario de IgG biotinilado anti-ratón de cabra (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos). Luego se realizó el revelado mediante la incubación con 50 ml de estreptavidina-R-PE (Qiagen, Venlo, Países Bajos) durante 10 minutos.

15 Inmediatamente antes de su uso, las perlas recubiertas se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. Luego, se añadió un volumen de 10 ml de perlas recubiertas con proteínas S1 y N (que contienen 1,250 perlas) a 100 ml de suero de pacientes o controles [diluido en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) más suero bovino fetal al 1%] en placas de fondo plano Pro de Bio-Plex (Bio-Rad). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador de placas a 650 rpm. En cada ensayo se incluyeron blancos (sin suero, solo Ab secundario), controles negativos (suero negativo de Ab anti-S1 y anti-N) y controles positivos (suero altamente positivo de Ab humano anti-S1 y anti-N). Las perlas se recolectaron con una lavadora magnética (Bio-Rad) y se lavaron dos veces con 150 ml de DPBS que contenía Tween-20 al 0.1%. Se añadió Ab secundario específico de IgG anti-ihumano de ratón biotinilado (Southern Biotech) a una dilución de 1:2,000 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación. Después del lavado, las perlas se incubaron con 50 ml de estreptavidina-R-ficoeritrina a una dilución 1:1,000 durante 10 minutos. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 100 ml de DPBS y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) en un aparato Bio-Plex<sup>R</sup> que utiliza Bio-Plex<sup>R</sup> Manager Software 4.0 (Bio-Rad) por investigadores experimentados (L.D., M.L.). En cada experimento se incluyó un calibrador (es decir, un suero humano de un paciente COVID-19 PCR positivo) con un valor de MFI que alcanzaba la meseta.

30 Las muestras de suero se analizaron inicialmente con una dilución de cribado de 1:100. El calibrador se utilizó a una dilución de 1:D' en el ensayo y su nivel se fijó arbitrariamente a 100 unidades arbitrarias (AU)/ml. Los niveles de Ab se determinaron a una dilución de 1:D, calculada mediante la siguiente fórmula:  $([\text{suero de MFI/calibrador de MFI}] \times \text{nivel de calibrador}) \times D/D'$ . Cuando la MFI de una muestra de suero determinada en una dilución 1:100 era superior al 70% de la MFI del calibrador, se realizaron diluciones adicionales. La primera dilución que produjo una MFI inferior al 70% de la MFI del calibrador se retuvo para el cálculo de las titulaciones de Ab (expresados en AU/ml).

35 Para determinar la repetibilidad, se realizó ALBIA 30 veces en el mismo suero positivo. El coeficiente de variación (CV) de la titulación se determinó como la proporción de la desviación estándar (DS) a la media.

Las curvas de características operativas del receptor (ROC) se computaron al variar el umbral de positividad de la prueba, incluido un valor que consiste en la media de + 3 DS de los controles negativos.

ALBIA para la detección y cuantificación de Abs IgM anti-S1 (ALBIA-IgM-S1)

40 Para detectar Abs IgM anti-S1, utilizamos el mismo protocolo que para ALBIA-IgG-S1/N excepto por las siguientes modificaciones. Solamente se utilizaron perlas acopladas a -S1. Los Abs IgM anti-S1 se revelaron utilizando un Ab IgM anti-humano de ratón biotinilado (Southern Biotech) a una dilución 1:2,000 durante 30 minutos. La repetibilidad y el nivel de Ab se determinaron como se describió anteriormente.

Ensayos comerciales de Ab para SARS-CoV-2

45 Los sueros se probaron utilizando un CLIA basado en N que detecta IgG (Abbott IgG SARS-CoV-2 para alinidad automática), un CLIA basado en Espícula -S1 y -S2 que detecta IgG (Diasorin IgG para enlace automático) y un ELISA anti-SARS-CoV-2 basado en S1-RBD que detecta Ig humano total (ELISA Wantai Ab SARS-CoV-2 en plataforma abierta SQ2), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

50 Las estadísticas se realizaron con el software Prism (GraphPad, La Jolla, CA). Las titulaciones de Ab se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La concordancia entre los métodos se analizó mediante la prueba de K. La interpretación de la prueba de K depende del valor calculado del coeficiente K: discrepancia entre las dos pruebas ( $K < 0$ ); acuerdo muy bajo ( $0 < K < 0.2$ ); acuerdo bajo ( $0.2 < K < 0.4$ ); acuerdo moderado ( $0.4 < K < 0.6$ ); buena concordancia ( $0.6 < K < 0.8$ ); y excelente concordancia ( $0.8 < K < 1$ ).

Resultados

Validación de ALBIA-IgG-S1/N y ALBIA-IgM-S1

5 Para permitir el análisis cuantitativo de IgG anti-S1/N o IgM anti-S1 en pacientes, desarrollamos dos ALBIAs (ALBIA-IgG-S1/N y ALBIA-IgM-S1, respectivamente). Para esto, utilizamos como antígeno la subunidad 1 (S1) de Espícula recombinante etiquetada con polihistidina y la proteína de nucleocápside (N) del SARS-CoV-2. La identidad y pureza de estas proteínas se confirmó mediante tinción con azul de Coomassie después de SDS-PAGE, revelando una banda única (datos no mostrados) que fue reconocida específicamente por un Ab anti-polihistidina en Western blot (datos no mostrados).

10 Los antígenos S1 y N se acoplaron covalentemente a perlas fluorescentes y se utilizaron para determinar los niveles de Abs IgG anti-S1 y N, o Abs IgM anti-S1. Un ejemplo del método utilizado para calcular el nivel anti-S1 se ilustra en la Figura 1. Se obtuvo una curva de calibración después de diluciones seriadas de un suero altamente anti-S1 positivo utilizado como calibrador. Se alcanzó una meseta de MFI para la dilución 1:400 (Figura 1A). En la dilución de cribado de 1:100, la muestra utilizada en este ejemplo mostró una señal de saturación (Figura 1B). Se retuvo una dilución superior de 1:800 para computar el nivel de Ab con referencia al calibrador cuyo nivel se estableció arbitrariamente en 100 AU/ml. Se utilizó el mismo método de cálculo para computar los niveles de Ab IgG anti-N e IgM anti-S1.

15 Se utilizó ALBIA-IgG-S1/N para investigar simultáneamente la presencia de Ab IgG anti-S1 y anti-N. Se calculó un umbral de positividad como la titulación media de + 3 DS de los 300 sueros de control negativos, que produjeron valores de 7.29 y 20.98 AU/ml para Ab IgG anti-S1 y anti-N, respectivamente (Figuras 1C, 1D). Para ALBIA-IgM-S 1, este umbral fue 23.64 AU/ml (Figura 1E).

20 Para evaluar la posible reactividad-cruzada en nuestro ALBIA entre Ab para anti-SARS-CoV-2 y otros coronavirus humanos, analizamos 17 sueros de 13 pacientes infectados con HKU1, OC43 o NL63. Se encontró una reactividad de IgG para S1, pero no a N solamente una vez, en dos sueros del mismo paciente muestreados en dos tiempos diferentes tras la infección con coronavirus humano NL63 (Figuras 1C-E). Además, se realizaron más pruebas a 70 pacientes con diferentes afecciones inflamatorias/autoinmunes que conducían a la producción de factor reumatoide u otros auto-Abs, por ejemplo, SLE, RA, SS o ASS. Todos obtuvieron resultados negativos, excepto por un paciente con lupus que dio débilmente positivo para IgG anti-N (Figuras 1C-E).

25 El rendimiento diagnóstico del ensayo se determinó utilizando una colección de 133 sueros de pacientes con PCR positiva para SARS-CoV-2 que se recolectaron al menos 14 días después de los primeros síntomas de COVID-19. El análisis de la curva ROC de ALBIA-IgG-S1/N confirmó la precisión del valor umbral antes mencionado, es decir, media + 3 DS. De hecho, la sensibilidad fue 97.7% y la especificidad fue 98.0% con un umbral de 7.29 AU/ml para IgG anti-S1 (2A, D). Para los Ab IgG anti-N, la sensibilidad fue 100 % y la especificidad fue 98.7 % con un umbral de 20.98 AU/ml (Figuras 2E). Para ALBIA-IgM-S1, la sensibilidad y especificidad fueron 74.8 y del 98.7% con un umbral de 23.64 AU/ml (Figuras 2C, F).

Repetibilidad de las medidas

35 La repetibilidad de la prueba se determinó calculando la variación intra-ensayo para un suero determinado. Los CVs fueron 4.5, 5.5 y 4.6% para IgG anti-S1, anti-N e IgM anti-S1, respectivamente (Figuras 1F-H), lo que indica una buena repetibilidad de esta ALBIA.

Frecuencia de seropositividad durante el período de seroconversión

40 De las 192 muestras de pacientes con PCR-positiva para SARS-CoV-2 analizadas en la presente, 19 se recolectaron hasta el día 7 después del inicio de los síntomas, 40 entre los días 7 y 13, y 133 en el día 14 o más después de los primeros síntomas. En los pocos pacientes asintomáticos de esta serie (n = 3), se utilizó en su lugar el momento de la PCR positiva para SARS-CoV-2. La tasa de positividad aumentó con el tiempo para todos los Abs probados (Figuras 3A-C). El ALBIA-IgG-S1/N multiplex obtuvo resultados positivos en un 53% en el día del grupo <7 (en comparación con un 37% para anti-S1 y un 42% para IgG anti-N cuando se consideran por separado; Figuras 3A,B), en un 75% en el grupo de los días 7-13 (en comparación con un 60% para anti-S 1 y un 73% para IgG anti-N; Figuras 3 A,B) y 100% en el grupo día > 13 (en comparación con 98% para anti-S1 y 100% para IgG anti-N; Figuras 2 A,B). A nivel de grupo, se observó un aumento en la titulación de Ab con el tiempo (valor de mediana en el grupo día <7, días 7-13 y día >13: IgG anti-S1, 6, 13 y 276 AU/ml; IgG anti-N, 11, 60 y 1,434 AU/ml; e IgM anti-S1, 3, 23 y 48 AU/ml, respectivamente). Todas las diferencias entre los grupos el día > 13 y los días 7-13, y entre el día > 13 y el día <7, fueron estadísticamente significativas (Figuras 2 D-E). Los niveles de IgG anti-N e IgM anti-S1 también fueron significativamente mayores en el grupo de los días 7-13 que en el grupo del día < 7 (p < 0.05 y < 0.01, respectivamente; Figuras 3 B,C), aunque el aumento de los niveles de IgG anti-S 1 no fue estadísticamente significativo (p = 0.08; Figura 3A). Cuando se analizó independientemente del momento de aparición de la enfermedad, 161 (84%) y 170 (89%) de los 192 pacientes de esta serie fueron positivos para IgG anti-S1 o anti-N, respectivamente. Los niveles de Ab en pacientes seropositivos fueron muy variables, oscilando de 7.5 a 19,944 AU/ml, y de 24.74 a 491,992 AU/ml para IgG anti-S1 o anti-N, respectivamente. Utilizando ALBIA-IgM-S1, 123 pacientes (64%) fueron positivos, con titulaciones que oscilaron de 24.03 y 676 AU/ml. Al combinar los resultados de los tres tipos de Ab (IgM, IgG S1 y N), la sensibilidad alcanzó 91%.

Niveles de Ab en pacientes que requieren cuidados críticos

De esta serie, 18 pacientes tenían una forma grave de enfermedad que requirió hospitalización en ICU. Los niveles de IgG anti-S1 (mediana = 511 AU/ml) y N (mediana = 2,930 AU/ml) fueron significativamente más altos en estos pacientes que en todos los demás pacientes (IgG anti-S1, mediana = 126 AU/ml; IgG anti-N, mediana = 696 AU/ml;  $p = 0.02$  y  $0.04$ , respectivamente). No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa para IgM anti-S 1 (no mostrado).

#### Comparación con ensayos EIA comerciales

El rendimiento de nuestro ensayo novedoso se comparó con el de diferentes ensayos comerciales en 76 muestras de suero disponibles (10, 20 y 70 en grupos día < 7, días 7-13 y día > 13, respectivamente). La concordancia global del ALBIA-IgGS1/N multiplex con los ensayos Diasorin y Abbott fue 91% y 93%, respectivamente, con coeficientes de K de 0.64 y 0.73 indicando una buena concordancia. Las pruebas discordantes fueron las siguientes: positividad de ALBIA cuando Diasorin fue negativo ( $n = 6/7$ ), negatividad de ALBIA cuando Diasorin fue positivo ( $n = 1/7$ ) y positividad de ALBIA cuando Abbott fue negativo ( $n = 5/5$ ). Además, analizamos los resultados de ALBIA de acuerdo con la reactividad antigénica (IgG anti-S o anti-N). La concordancia de ALBIA IgG anti-S con Diasorin fue 93% con un coeficiente de K de 0.74 (buena concordancia). La concordancia de ALBIA IgG anti-N con Abbott fue 97% con un coeficiente de K de 0.91 (excelente concordancia). La concordancia de ALBIA IgG + IgM con el ensayo Wantai (detección de Abs totales) fue 95% con un coeficiente K de 0.80 (excelente concordancia).

#### Discusión

En este estudio, reportamos la alta sensibilidad y especificidad de un nuevo ALBIA multiplex para explorar la respuesta inmune humoral a la subunidad S1 (IgG e IgM) del SARS-CoV-2 y la proteína N de la nucleocápside (IgG). Desde la aparición de la COVID-19 a finales de 2019, se han realizado esfuerzos para desarrollar pruebas serológicas cuyas limitaciones han sido ampliamente reseñadas (Duong et al., 2020; Lai et al., 2020; Smithgall et al., 2020). Diferentes autoridades sanitarias u organizaciones científicas han emitido recomendaciones sobre el desempeño que deben tener las pruebas serológicas, es decir, una especificidad clínica de al menos 98% y una sensibilidad clínica de 90% o más (Farnsworth and Anderson, 2020; Haute Autorité De Santé [HAS], 2020). Nuestro ALBIA-IgG-S multiplex 1/N cumple en gran medida estos criterios y confirma el excelente rendimiento de los inmunoensayos con perlas de acuerdo con un reporte reciente (Ayoubaa et al., 2020). Nuestro estudio muestra además que la sensibilidad del ALBIA-IgM-S1 monoplex se mantiene alrededor del 75%, lo que destaca el hecho de que no todos los pacientes con COVID-19 producen niveles detectables de IgM (Guo et al., 2020; Liu et al., 2020).

En un gran metaanálisis se ha considerado que el rendimiento de las pruebas serológicas actuales para COVID-19 es perfectible (Lisboa Bastos et al., 2020). Las diferencias observadas en la sensibilidad de dichas pruebas dependen de la fuente antigénica utilizada para cada ensayo. Incluso si se espera que los Abs dirigidos contra la proteína S viral del SARS-CoV-2 aparezcan antes que los dirigidos contra la proteína N (Liu et al., 2020), se ha demostrado que los Abs específicos de -N eran más sensibles que los Abs específicos de -S para detectar infección temprana (Burbelo et al., 2020). Por tanto, los ensayos multiplex ofrecen varias ventajas. Al permitir el análisis simultáneo de las respuestas inmunes a diferentes antígenos, aumentan la sensibilidad de la prueba. De hecho, independientemente del momento de aparición de la enfermedad, la sensibilidad del ensayo multiplex de IgG anti-S1 más anti-N (90%) fue mayor que la sensibilidad de las IgG anti-S1 y anti-N tomadas por separado (84 y 89%, respectivamente). La sensibilidad aumenta a 91% si también se tienen en cuenta los resultados del ensayo de IgM anti-S1. Finalmente, combinar varios antígenos en el mismo pocillo reduce el coste y el tiempo de manipulación del ensayo.

La cuantificación de IgM e IgG anti-S 1 permite el estudio de la dinámica poblacional de la respuesta de Ab IgG anti-S 1. Nuestros resultados confirman que se recomienda un retraso de 2-semanas para analizar Ab IgG en pacientes expuestos al SARS-CoV-2 de acuerdo con la literatura (Huang, 2020). Además, los niveles de IgG de pacientes gravemente enfermos que requirieron hospitalización en la unidad de cuidados intensivos fueron significativamente más altos que los de pacientes con enfermedad más leve, de acuerdo con un informe reciente (Long et al., 2020).

El rendimiento diagnóstico de ALBIA es equivalente a los mejores ELISAs o CLIAS reportados en la literatura (Bischof et al., 2020; Bryan et al., 2020; Kruttgen et al., 2020; Mahase, 2020; Montesinos et al., 2020; Traugott et al., 2020). Por lo tanto, comparamos nuestro ensayo novedoso con diferentes ensayos CLIA o ELISA disponibles comercialmente. Globalmente, nuestro ensayo multiplex fue más sensible que los otros ensayos probados. La mejor correlación se encontró con el Wantai ELISA, que detecta Abs totales contra el antígeno S1-RBD del SARS-CoV-2, un ensayo ya destacado por su excelente desempeño (GeurtsvanKessel et al., 2020).

En conclusión, hemos desarrollado un ensayo serológico altamente sensible y específico para explorar la inmunidad humoral para SARS-CoV-2. Esto convierte a ALBIA en una herramienta adecuada para el diagnóstico y seguimiento de COVID-19, estudios epidemiológicos o de vacunación o para investigar el papel del SARS-CoV-2 en formas atípicas de la enfermedad (Hebert et al., 2020).

#### Referencias:

Arnett, F. C. et al. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum* 31, 315-324.

- Ayoubaa, A., et al. (2020). Multiplex detection and dynamics of IgG antibodies to SARS-CoV2 and the highly pathogenic human coronaviruses SARSCoV and MERS-CoV. *J. Clin. Virol.* 129:104521. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104521
- Benveniste O et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011 Jul;63(7):1961-71.
- 5 Bischof, E., et al. (2020). Understanding COVID-19 new diagnostic guidelines - a message of reassurance from an internal medicine doctor in Shanghai. *Swiss Med. Wkly.* 150:w20216.
- Bryan, A, et al. (2020). Performance Characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG Assay and Seroprevalence in Boise, Idaho. *J. Clin. Microbiol.* 58:e00941-20.
- Burbelo, P. D., et al. (2020). Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* 222, 206-213. doi: 10.1093/infdis/jiaa273
- 10 Drouot L et al. Exploring necrotizing autoimmune myopathies with a novel immunoassay for anti-3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2014 Feb 3;16(1):R39.
- Duong, Y. T., Wright, G., and Justman, J. (2020). Antibody testing for coronavirus disease 2019: not ready for prime time. *BMJ* 370:m2655. doi: 10.1136/bmj.m2655
- 15 Farnsworth, C. W., and Anderson, N. W. (2020). SARS-CoV-2 serology: much hype, little data. *Clin. Chem.* 66, 875-877. doi: 10.1093/clinchem/hvaa107
- GeurtsvanKessel, C. H., et al. (2020). An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat. Commun.* 11:3436.
- 20 Guo L et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020 Mar 21. pii: ciaa310.
- Hebert, V., et al. (2020). Lack of association between chilblains outbreak and SARS-CoV-2: histological and serological findings from a new immunoassay. *J. Am. Acad. Dermatol.* 83, 1434-1436. doi: 10.1016/j.jaad.2020.07.048
- Huang, A. T. (2020). Systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv* [preprint]. doi: 10.1101/2020.04.14.20065771
- 25 Kruttgen, A., et al. (2020). Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARSCoV-2 IgG. *J. Clin. Virol.* 128:104394. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104394
- Lai, C. C., Wang, C. Y., Ko, W. C., and Hsueh, P. R. (2020). In vitro diagnostics of coronavirus disease 2019: technologies and application. *JMII* [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.jmii.2020.05.016
- 30 Lisboa Bastos, et al. (2020). Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and metaanalysis. *BMJ* 370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516
- Liu W et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Pr 1 otein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.1101/2020.03.16.20035014>
- 35 Long, Q. X., et al. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* 26, 845-848.
- Mahase, E. (2020). Covid-19: two antibody tests are "highly specific" but vary in sensitivity, evaluations find. *BMJ* 369:m2066. doi: 10.1136/bmj.m2066
- Meyer, B., Drosten, C., and Muller, M. A. (2014). Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res.* 194, 175-183. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.018
- 40 Montesinos, I., et al. (2020). Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J. Clin. Virol.* 128:104413. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104413
- Okba N et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>.
- Smithgall, M. C., et al (2020). Types of assays for SARS-CoV-2 testing: a review. *Lab. Med.* 51, e59-e65. doi: 10.1093/labmed/lmaa039
- 45 Tan, E. M., et al. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum* 25, 1271-1277. doi: 10.1002/art.1780251101
- Traugott, M., et al. (2020). Performance of SARS-CoV-2 antibody assays in different stages of the infection: comparison of commercial ELISA and rapid tests. *J. Infect. Dis.* 222,352-366.
- 50 Troyanov, Y., et al. (2005). Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine* 84, 231-249. doi: 10.1097/01.md.0000173991.74008.b0
- Vitali, C., et al. (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 554-558. doi: 10.1136/ard.61.6.554
- 55 Xia N et al. Serological Test is an Efficient Supplement of RNA Detection for Confirmation of SARS-CoV-2 Infection. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0184.v1>.
- Xiang J et al. Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold-Immunochemical Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19). *BMJ* doi:10.1101/2020.02.27.20028787
- 60 Xue-fei C et al. A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). <https://doi.org/10.1101/2020.02.22.20026617>

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 en un sujeto, que comprende los pasos de:
- 5 a) colocar una muestra que se ha obtenido del sujeto en un único receptáculo de ensayo, en la presencia de una pluralidad de partículas pertenecientes a al menos dos grupos diferentes, uno de los grupos estando conjugado con un primer polipéptido coronaviral y un otro grupo estando conjugado con un segundo polipéptido coronaviral,
- b) incubar la mezcla bajo condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos en cada grupo de partículas,
- c) eliminar de la mezcla del paso b) las inmunoglobulinas que no se han unido a las partículas,
- 10 d) incubar la mezcla del paso c) con al menos un anticuerpo IgG anti-humano que está acoplado a un marcador fluorescente;
- e) eliminar de la mezcla del paso d) los anticuerpos IgG anti-humano no unidos a los inmunocomplejos formados en el paso b), y
- 15 f) detectar simultáneamente, por medio de un detector capaz de diferenciar los al menos dos grupos de partículas mencionados anteriormente, los inmunocomplejos formados en el paso d) en cada partícula, por lo cual se revela la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 y en el que se mide la fluorescencia del marcador fluorescente para cuantificar los anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 detectados,
- en el que uno del primer y segundo polipéptido coronaviral deriva de la nucleoproteína (N) del SARS-CoV-2 y el otro polipéptido coronaviral deriva de la subunidad S1 de la proteína espícula (S) del SARS-CoV-2.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra se obtuvo del sujeto más de 13 días después de la infección por SARS-CoV-2.
3. El método de la reivindicación 1 y la reivindicación 2, en el que los grupos de partículas difieren uno de otro por sus códigos de identidad.
4. Uso del método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.
- 25 5. Un método para determinar si un sujeto logra una protección con una vacuna o un candidato a vacuna contra el SARS-CoV-2 comprendiendo i) detectar mediante la realización del método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2, y ii) concluir que el sujeto logra una protección con la vacuna o candidato a vacuna cuando se detecta la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2.
- 30 6. Un método para determinar si un sujeto debe ser vacunado contra SARS-CoV-2, comprendiendo dicho método i) detectar, mediante la realización del método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2, y ii) concluir que el sujeto tiene que ser vacunado cuando se detecta la ausencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 o por el contrario no necesita ser vacunado si se detecta la presencia de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2.
- 35 7. Un kit para realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo las partículas y los anticuerpos secundarios de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

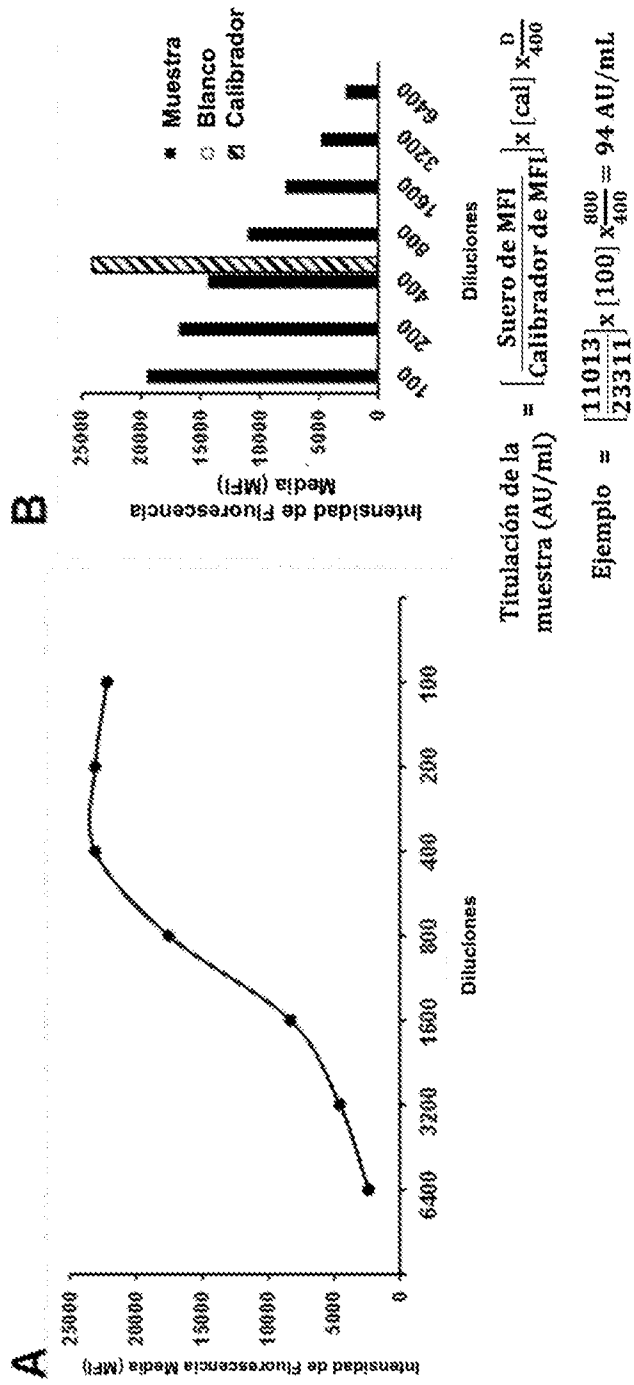


Figura 1A y 1B

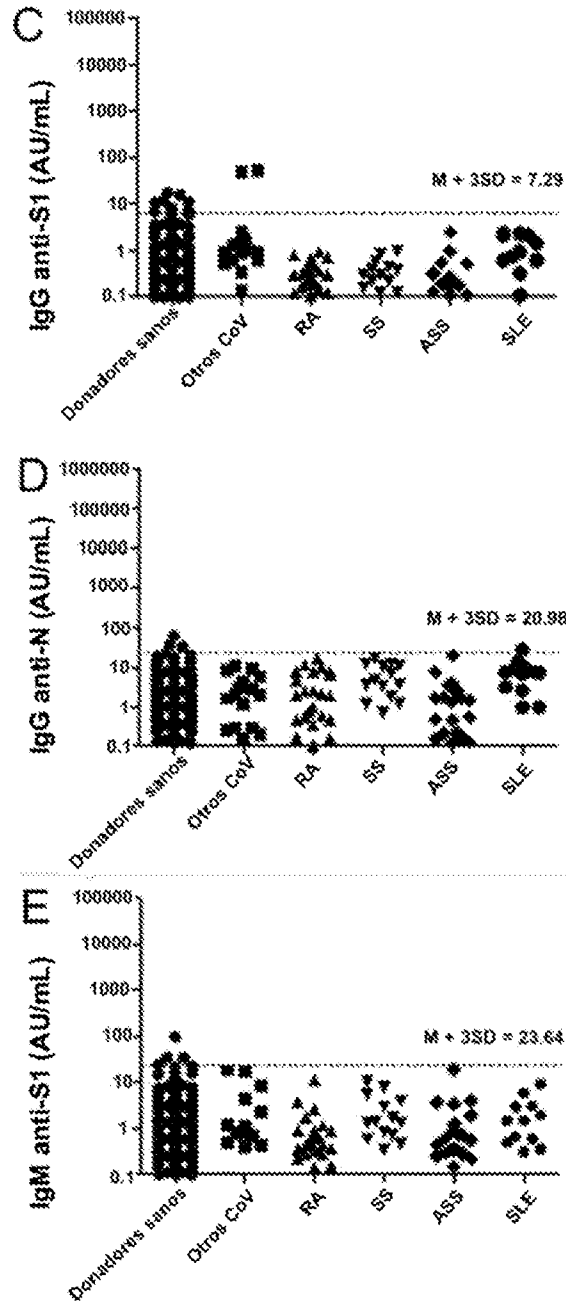


Figura 1C-1E

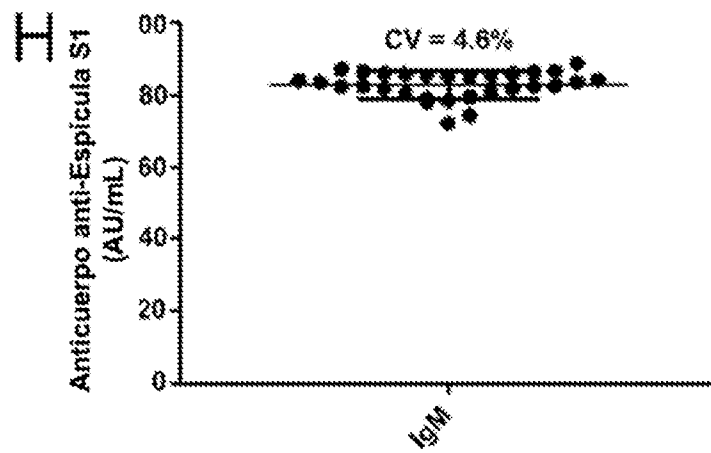
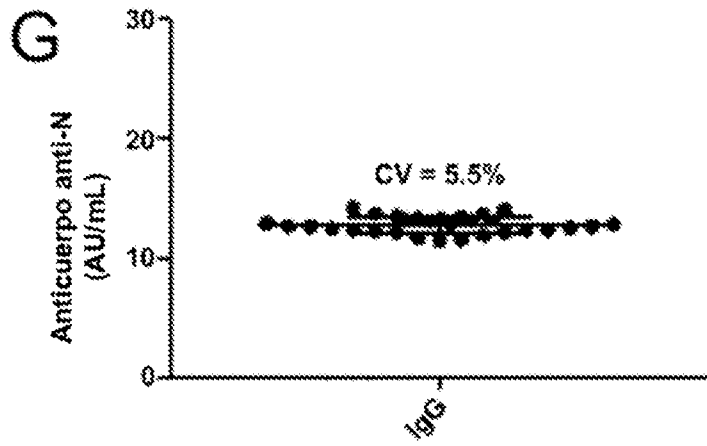
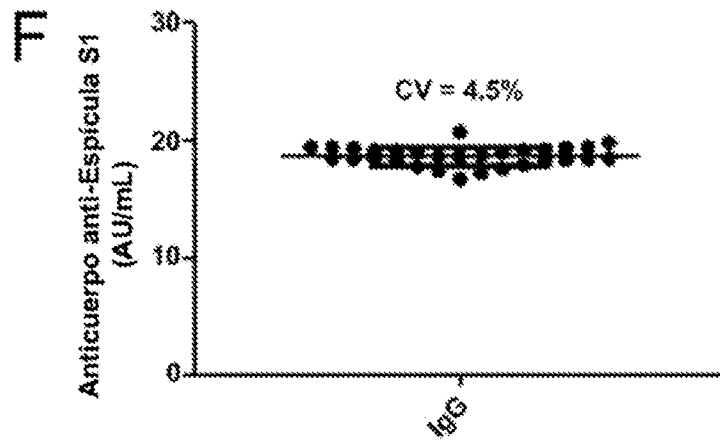


Figura 1F-H

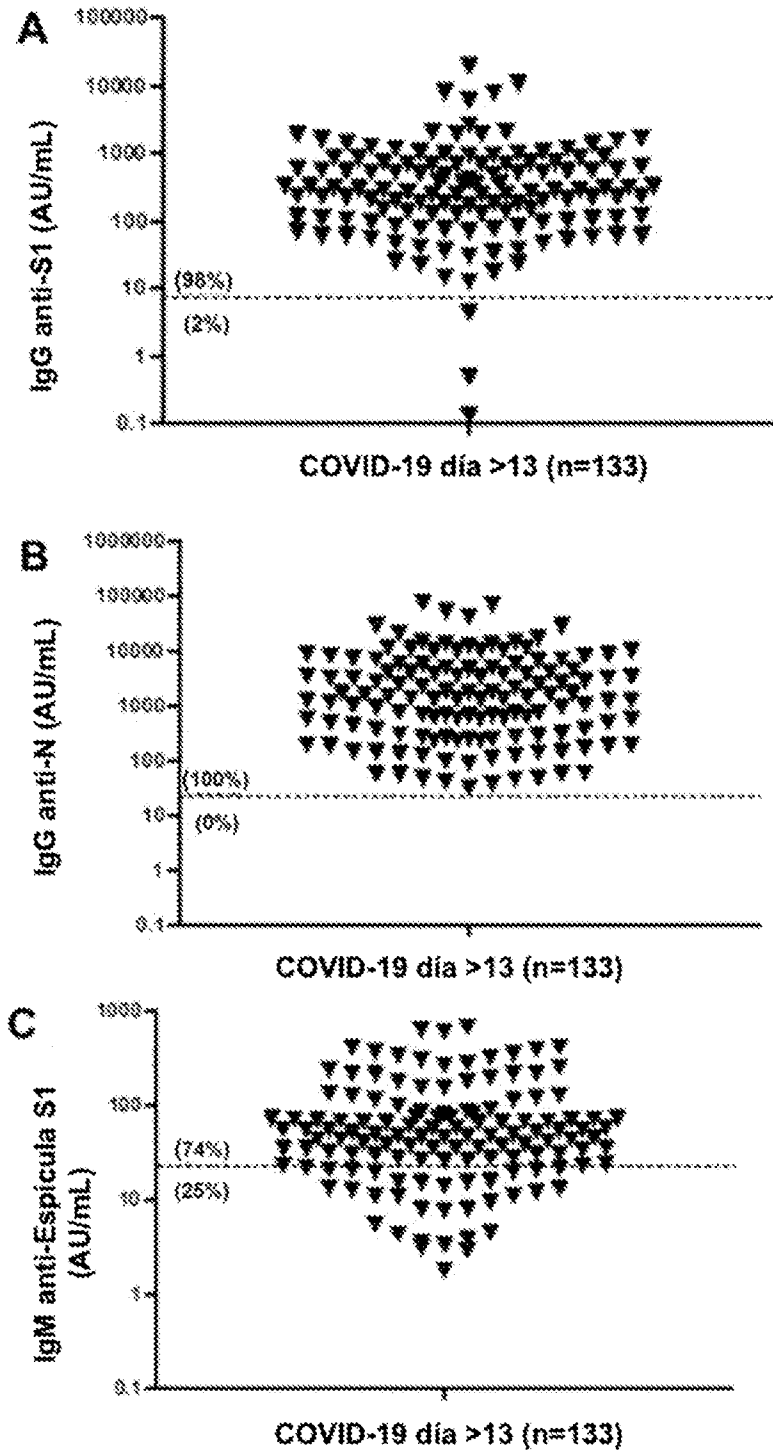


Figura 2A-C

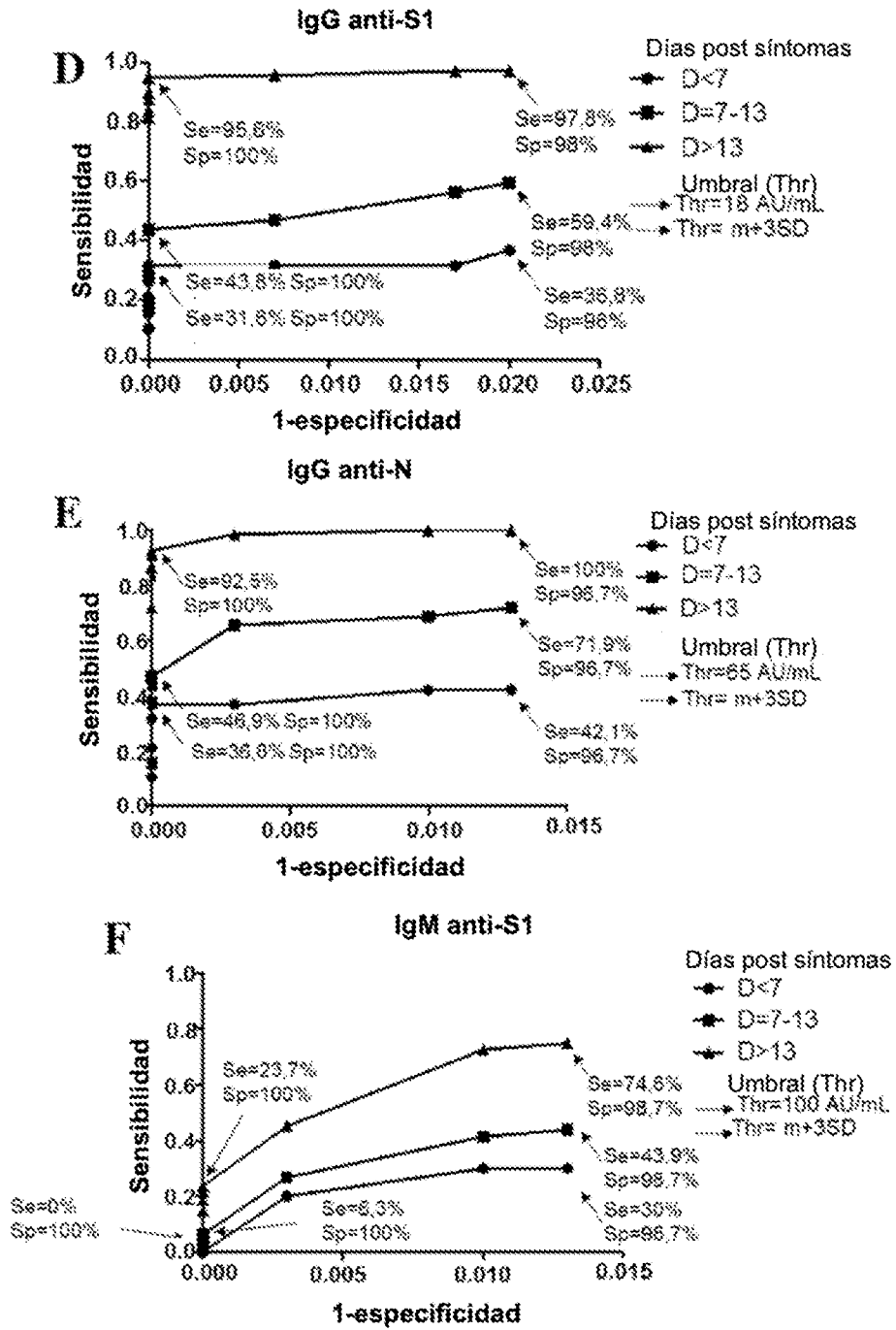


Figura 2D-F

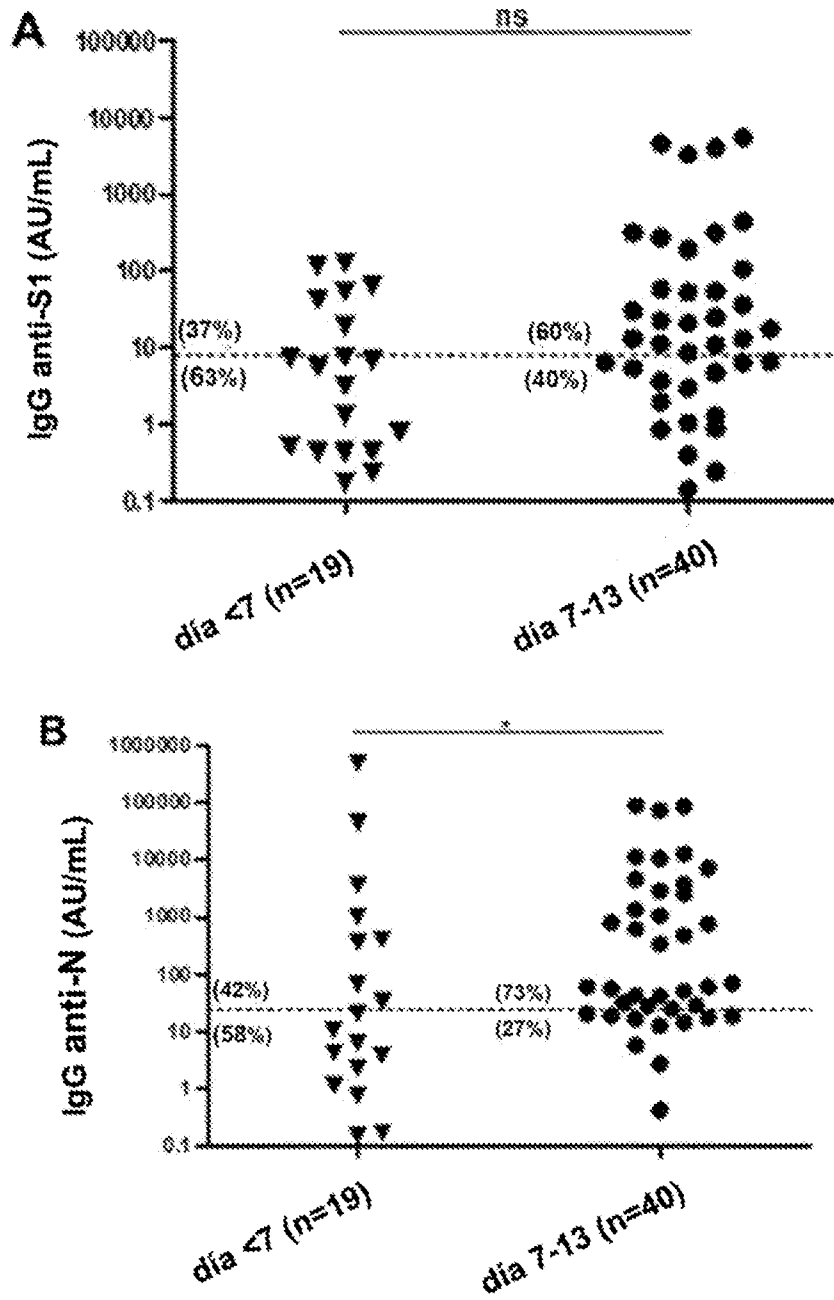


Figura 3A y 3B

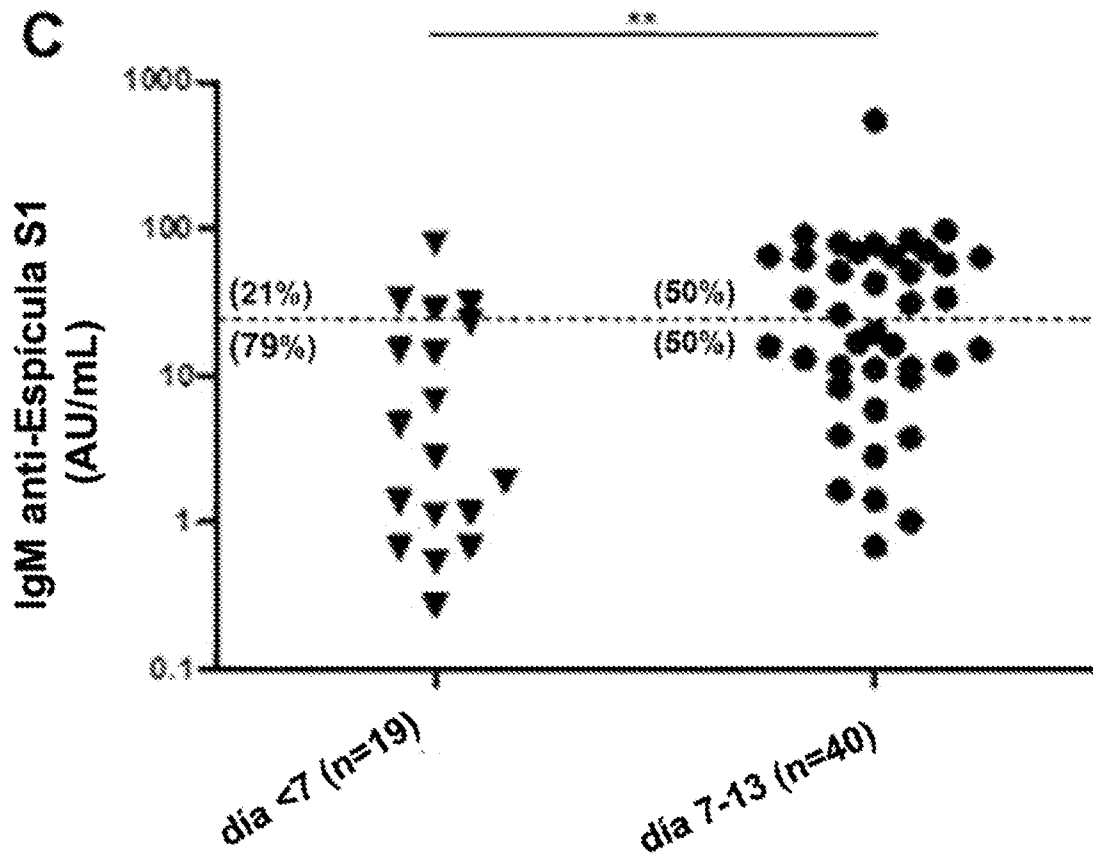


Figura 3C