

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

Respuesta inmunitaria adaptativa a la infección natural y a la  
vacunación por SARS-CoV-2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Almendro Vázquez

DIRIGIDA POR

Estela Natividad Paz Artal

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**



**TESIS DOCTORAL**

Respuesta inmunitaria adaptativa a la infección natural y a la  
vacunación por SARS-CoV-2

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Almendro Vázquez

DIRECTORA

Estela Natividad Paz Artal

**Madrid, 2024**





## *A los míos...*

“Lo busqué, pero no existía, en toda aquella inmensa ciudad había de todo. Había de todo, pero no había *un final*.”

Novecento,  
Alessandro Baricco.



# AGRADECIMIENTOS

---



Es difícil explicar en un trabajo lo que implica hacer una tesis doctoral. Algo similar ocurre con los agradecimientos.

En primer lugar, me gustaría empezar por Estela, mi directora de tesis. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo e iniciarme en el mundo de la Inmunología. Gracias por guiarme en esta tesis que llegó de forma inesperada, por todas las oportunidades, los éxitos y algunos fracasos, de los que, sin duda, siempre se aprende. Gracias por todo lo que he aprendido durante estos cinco años, no sólo me has ayudado a alcanzar metas académicas, sino que también me has proporcionado herramientas y perspectivas que sin duda seguiré aplicando a lo largo de toda mi carrera.

A mi tutor, Pedro Reche, por su supervisión y seguimiento de las actividades de este doctorado.

A Rocío, por toda la ayuda brindada en mis primeros proyectos. Gracias por tu paciencia, tus consejos y tu perspectiva. Y también por amenizar los momentos más duros de trabajo y correcciones con las historias de tus niños.

Gracias a Marta y a Ceci, sin ellas esta tesis no sería posible. Gracias por hacer de ese cubículo de la séptima, hogar. Nunca podría haber deseado mejores compañeras – compañeras que ya son más que amigas –. Gracias por encarnar los conceptos de ayuda y apoyo. Por estar siempre, por enseñarme tanto y por ser el empujón que muchas veces he necesitado. Gracias por los momentos de risas, por los consejos, por las lágrimas, por los corrillos y, en definitiva, por demostrarme que en la Ciencia también se encuentran amigas de verdad. Ceci, eres un soplo de aire fresco, traes siempre risa y ganas de continuar. Eres un ejemplo de constancia y superación. Ojalá vivir siempre rodeada de tu alegría. Marta, eres excepcional, aún consigues impresionarme con tu memoria y tu inteligencia. Brillas con luz propia, y no imagino barrera que no consigas sortear. Ojalá tener siempre cerca tu pasión. Sois mi yin y mi yang. Mi Martiflor y mi Cecipons. Gracias por tanto.

Cómo no estar agradecida a Miguel, que llegó cuando más le necesitábamos y logró completar el Cónclave. Has sido el mejor compañero de campana durante esas interminables tardes de pandemia, sin ti esta tesis no habría sido posible. Gracias por tu compromiso y dedicación, por los festivos y fines de semana trabajados, por hacerme reír

y amenizar cada segundo que he trabajado a tu lado y, sobre todo, por enseñarme de verdad cómo funciona el Hospital. Te debo mucho. Esta tesis también es tuya, amigo.

A Alberto, que desde el principio me enseñó y acogió en el grupo, actuando como compañero y post-doc. A Marcos, que desde estudiante nos llenó con su energía y buen rollo, gracias por las risas y los momentos de complicidad, titán.

Nunca me olvidaría de Sara, mi investigadora y Madrid-centrista favorita. Parece que estábamos destinadas a encontrarnos y cómo me alegro de que por fin haya sido así. Sin ti mi relación con el Servicio no habría sido la misma. Gracias por ser nexo. Gracias por traer siempre alegría, por ayudarme y acogerme, por tu cariño, por defender el barrio y por seguir diciendo “la” (aunque a veces te entren dudas). Allá donde vas logras construir una familia.

Gracias a las cinco generaciones de residentes con las que he tenido el placer de coincidir, con especial mención a Javi Gil y Ángel. Aunque un lugar único guardan para mí María y Dani, nuestros resis e investigadores del GIDIT, la séptima no logró ser lo mismo desde que os fuisteis. María, gracias por tu tenacidad y desempeño, por Alicante y por los últimos meses como hija adoptiva de la séptima. Dani, gracias por tu ternura y preocupación, por guardar los secretos de las meteduras de pata y por estar siempre dispuesto a ayudar con una sonrisa. Habéis sido un regalo. Gracias también a los nuevos pollitos, Ángel A. y Carlota, por ser un soplo de aire fresco y llegar con tantas ganas al grupo. Gracias al resto de investigadoras de Inmuno, en especial a Marta López y Celia, y a las chicas de la UNICA.

Gracias al maravilloso equipo de técnicos y adjuntos del Servicio, con especial cariño para Esther y Mari Jose, muchas gracias por brindarme vuestra ayuda siempre que la he necesitado.

También quiero agradecer a todo el personal colaborador que ha hecho viable este proyecto. Al equipo de médicos, técnicos y enfermeras del Hospital que me han enseñado la importancia de que funcionen bien todos los engranajes. A los pacientes, donantes y voluntarios – que no hemos sido pocos – por facilitarnos las muestras. Sin vosotros y vuestra colaboración no habría avance ni investigación posible.

Por supuesto, quiero darle profundamente las gracias a mi familia. A mi padre, a mi madre y a Miguel por darme la mejor educación, por proporcionarme todos los medios y recursos desde pequeña y por enseñarme a ser responsable, curiosa y decidida. Gracias por ayudarme a conseguir mis metas, por confiar en mí y por apoyarme ante todo. Sin vosotros y vuestros esfuerzos no habría llegado donde estoy. Simplemente os debo todo lo que he conseguido y lo que soy y, por ello, no puedo ser más afortunada. Cómo no, gracias a mi hermana, Sara, por enseñarme el verdadero significado del amor. Por tus tonterías, tu risa y verte crecer cada día. Eres el apoyo más bonito que me ha regalado la vida.

A las de siempre, Susana, Betsabé, Noelia y Alejandra, por mostrarme desde hace ya casi 27 años lo que es la verdadera amistad. Sin vosotras, vuestro apoyo y consejos no sería quién soy y, muy probablemente, no estaría escribiendo estas palabras.

Para terminar, quiero mencionar de forma especial a los tres pilares de mi hogar. A Lulo y Pistacho por enseñarme el amor en su versión más pura. Sois los mejores compañeros de escritura y mi abrazo más reconfortante. A Alberto, que desde que comenzamos nuestra aventura juntos has sido ancla y faro. Has sabido apoyarme y guiarme cuando me encontraba perdida y me das fuerzas para seguir siendo más y mejor cada día. Simplemente, gracias por ser mi compañero de vida.

Sin vosotros mi vida no tendría este color.

---

*Así, a todos vosotros, mis amigos y familia, os  
dedico esta tesis.*



# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>SUMMARY</b> .....	15
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	21
<b>1. CONTEXTO DE LA PANDEMIA COVID-19</b> .....	23
<b>2. CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURA DEL SARS-CoV-2</b> .....	24
2.1. Familia <i>Coronaviridae</i> .....	24
2.2. Origen y transmisión del SARS-CoV-2 .....	25
2.3. Ciclo viral del SARS-CoV-2 .....	26
2.3.1. Entrada viral .....	26
2.3.2. Síntesis y traducción de ARN .....	29
2.3.3. Proteínas estructurales y ensamblaje del virión .....	31
2.4. Variantes de interés del SARS-CoV-2 .....	33
<b>3. ESPECTRO CLÍNICO DE LA COVID-19 Y FACTORES DE RIESGO DE LAS FORMAS GRAVES</b> .....	34
3.1. Manifestaciones respiratorias .....	36
3.2. Manifestaciones extrapulmonares .....	37
3.3. Factores de riesgo y biomarcadores de la COVID-19 grave .....	39
<b>4. RESPUESTA ANTIVIRAL DEL SISTEMA INMUNITARIO</b> .....	41
4.1. Inmunidad Innata .....	41
4.2. Inmunidad Adaptativa .....	42
4.3. Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2 .....	43
4.3.1. Inmunidad Innata en la COVID-19 .....	43

4.3.2. Inmunidad Adaptativa en la COVID-19 .....	42
4.4. Alteraciones inmunitarias en COVID-19 .....	46
4.5. Escape del virus frente a la respuesta inmunitaria .....	50
<b>5. VACUNACIÓN FRENTE A COVID-19 .....</b>	<b>52</b>
5.1. Estrategias vacunales .....	53
5.2. Respuesta inmunitaria a la vacunación frente a SARS-CoV-2 .....	56
5.3. Inmunidad híbrida .....	58
<b>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULOS .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 1: <i>Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination</i></b> .....	67
Introducción .....	69
Objetivos .....	69
Conclusiones .....	70
Publicación .....	73
<b>CAPÍTULO 2: <i>Cellular and humoral immune responses and breakthrough infections after three SARS-CoV-2 mRNA vaccine doses</i></b> .....	109
Introducción .....	111
Objetivos .....	111
Conclusiones .....	112
Publicación .....	115
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>152</b>

# ABREVIATURAS

---



3CL<sup>pro</sup>: proteasa de tipo 3C

6-HB: haz de seis hélices

## A

ACE2: enzima convertidora de angiotensina tipo 2

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ad26: adenovirus humano de tipo 26

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Ang: angiotensina

AP-1: proteína activadora 1

APC: célula presentadora de antígenos

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

Asn: asparragina

Asp: aspartato

## B

bp: pares de bases

BST: antígeno estromal de médula ósea 2

## C

Cap-5': casquete 5'

CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades

CDS: detectores citosólicos de ADN

COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019

CTL: linfocito T citotóxico

C-RTC: complejo de replicación y transcripción central

## D

Da: Dalton

DAMP: patrones moleculares asociados a daño o lesión

DC: células dendríticas

DMV: vesículas de doble membrana

## **E**

E: proteína de la envoltura del SARS-CoV-2

ERGIC: compartimento intermedio retículo endoplasmático-Golgi

E-RTC: complejo de replicación y transcripción de elongación

EMA: Agencia Europea del Medicamento

## **F**

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos Americana

FP: péptido de fusión

## **G**

Gln: glutamina

## **H**

HCoV: coronavirus humano

HLA-DR: antígeno leucocitario humano – isotipo DR

HR: repetición heptada

## **I**

IC: intervalo de confianza

IFIT: proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos

IFITM3: proteína transmembrana inducida por interferón 3

IFN: interferón

IFNAR1: cadena  $\alpha$  del receptor de IFN

IL: interleuquina

ILC: células linfocíticas innatas

IP-10: proteína-10 inducida por IFN- $\gamma$

IRF: factores reguladores del interferón

IRF3: factor regulador del IFN 3

ISG: genes estimulados por interferón

## J

JAK: janus quinasa

## K

Kb: kilobase

## L

Leu: leucina

LNP: nanopartículas lipídicas

LY6E: complejo 6 del antígeno linfocitario, locus E

## M

M: proteína de la membrana del SARS-CoV-2

M<sup>pro</sup>: proteasa principal

MAVS: proteína de señalización antiviral mitocondrial

MDA5: gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma

MDSC: células mieloides supresoras

MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MIP: proteína inflamatoria de macrófagos

MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

## N

N: proteína de la nucleocápside del SARS-CoV-2

NET: trampas extracelulares de neutrófilos

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: linfocitos *Natural Killer*

NLR: receptores tipo NOD

NRP1: neurofilina-1

Nsp: proteína no estructural

## **O**

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

ORF: marco de lectura abierto

## **P**

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: proteína de muerte programada

PEG: polietilenglicol

Phe: fenilalanina

PL<sup>pro</sup>: proteasa de tipo papaína

PRR: receptores para el reconocimiento de patrones

## **R**

RBD: dominio de unión al receptor

RBM: motivo de unión al receptor

RE: retículo endoplasmático

RIG-I: gen inducible por ácido retinoico I

RLR: receptores tipo RIG

RNP: complejo protector de ribonucleoproteína

RTC: complejo de replicación y transcripción

## **S**

S: proteína de la espícula del SARS-CoV-2

S1: subunidad 1 de la espícula del SARS-CoV-2

S2: subunidad 2 de la espícula del SARS-CoV-2

SARS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave

SARS-CoV-2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2

scRNA-seq: análisis de secuenciación de ARN de célula única

SDRA: síndrome de distrés respiratorio agudo

Ser: serina

SFU: unidades formadoras de puntos

STAT: gen transductor de señal y activador de transcripción

## **T**

TC: tomografía computarizada

Tfh: linfocitos T cooperadores foliculares

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$

Th: linfocitos T *helper* o cooperador

TIM3: inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3

TLR: receptores tipo toll

TMPRSS2: proteasa transmembrana de serina 2

TNF: factor de necrosis tumoral

TRIF: proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón- $\beta$

Tyr: tirosina

## **U**

UCI: unidad de cuidados intensivos

UTR: regiones no traducidas

## **V**

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VoC: variantes preocupantes

## **Z**

ZAP: proteína antiviral con dedos de zinc



# RESUMEN

---



**Introducción:** La infección por SARS-CoV-2 es responsable de la pandemia de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), cuyo amplio espectro clínico oscila entre infecciones asintomáticas o manifestaciones leves de tipo gripal, hasta neumonías potencialmente mortales. Las formas graves de la enfermedad se asociaron tempranamente a características demográficas, como la edad y el sexo masculino, y a la presencia de comorbilidades. Asimismo, en pacientes graves y críticos se describieron alteraciones en el perfil inmunitario incluyendo linfopenia o neutrofilia, un predominio inflamatorio con hiperactivación de macrófagos y tormenta de citoquinas, así como una respuesta de IFN tipo I deteriorada. Sin embargo, la información disponible en 2020 y 2021 sobre el papel de la inmunidad adaptativa en la infección por SARS-CoV-2 y su relación con las formas clínicas de distinta gravedad de la COVID-19 así como el mantenimiento de la memoria inmunológica resultante era muy limitada.

Paralelamente, la vacunación frente a SARS-CoV-2 demostró ser la medida más eficaz para controlar la pandemia COVID-19. Los protocolos de vacunación masiva se iniciaron en diciembre de 2020 con las vacunas de ARNm de Pfizer/BioNTech y Moderna que codifican una versión estabilizada de la espícula completa del virus. Sin embargo, se desconocía la respuesta inmunitaria frente a estas nuevas formulaciones vacunales basadas en ARNm encapsulado. Los resultados publicados se referían a los ensayos clínicos realizados con estas vacunas, pero los estudios en población general en el mundo real eran inexistentes.

**Objetivos:** Los objetivos generales de este trabajo se extienden en dos líneas: i) entender cómo se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa tras la infección natural por SARS-CoV-2, su relación con las formas clínicas de distinta gravedad de la COVID-19 y su mantenimiento a largo plazo; y ii) comprender cómo se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa tras la vacunación, su cinética a largo plazo, su relación con la protección frente a infecciones posteriores y el efecto de las dosis de refuerzo en la inmunidad preexistente.

**Resultados:** La inducción de una respuesta celular temprana frente a SARS-CoV-2 es esencial para el control de la enfermedad. Los pacientes que no desarrollan una respuesta T específica e inician una respuesta humoral con la subsiguiente producción de altos niveles de anticuerpos, no son capaces de controlar y eliminar eficazmente el virus y desarrollan síntomas graves. Concretamente, se demostró que la presencia de células T

específicas frente a SARS-CoV-2 a la llegada a urgencias, previa a cualquier intervención terapéutica, es un factor pronóstico y protector contra el desarrollo de COVID-19 grave, independientemente de la edad y el sexo. Entre los pacientes recuperados de COVID-19, el 97% y el 99% mantienen, respectivamente, respuesta celular y humoral de 4 a 7 meses tras la infección, observándose una disminución progresiva únicamente de los niveles de anticuerpos y su actividad neutralizante. Además, las células T de memoria específicas frente al virus (predominantemente IL2<sup>+</sup>) son detectables en sangre periférica hasta 22 meses después de la infección aguda.

Con respecto a la vacunación de ARNm, dos dosis de la vacuna BNT162b2 de Pfizer/BioNTech inducen el desarrollo paralelo y coordinado de una respuesta celular Th1 y una robusta producción de anticuerpos frente a la espícula del SARS-CoV-2, cuya máxima magnitud se alcanza a los 15 días tras la segunda dosis. El pico de células T y anticuerpos IgG alcanzado es similar en individuos con infección previa a la vacunación y *naïve* para SARS-CoV-2. Sin embargo, la capacidad neutralizante adquirida por los sujetos *naïve* es significativamente menor. En ambas cohortes, la respuesta celular se mantiene estable entre 3 y 6 meses, sin embargo, la respuesta humoral disminuye significativa y progresivamente. Durante los meses posteriores a la segunda dosis, la respuesta adaptativa permanece significativamente más alta en los individuos recuperados de COVID-19 en comparación con los sujetos *naïve*. Este mayor descenso de células T, IgG y anticuerpos neutralizantes en los individuos *naïve* se asocia a infecciones de brecha. Sin embargo, el refuerzo de la inmunidad adaptativa provocado por la vacunación en sujetos con COVID-19 previa confiere una protección extra, incluso frente a la variante Ómicron. Asimismo, se identificó que el desarrollo de una robusta respuesta de células T y anticuerpos neutralizantes a los 15 días tras la segunda dosis se asocia con protección frente a la infección. El principal efecto de la tercera dosis de refuerzo es un aumento de hasta 20 veces en la capacidad de neutralización de los individuos no expuestos previamente al virus, equiparando por primera vez la actividad neutralizante en ambos grupos.

**Conclusiones:** La dinámica de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a SARS-CoV-2 se asocia con la gravedad de la COVID-19. La inducción temprana de una respuesta de células T seguida de una respuesta humoral controlada es esencial para limitar la infección aguda. Los pacientes que fracasan en el desarrollo de inmunidad T

específica progresan a formas graves de la enfermedad y acumulan mayor mortalidad. Además, tras la infección y/o la vacunación únicamente la memoria celular desarrollada se mantiene estable. La vacunación BNT162b2 refuerza la inmunidad adaptativa frente a SARS-CoV-2 en sujetos con COVID-19 previa. Estos sujetos con inmunidad híbrida exhiben, durante los 6 meses posteriores a la segunda dosis, una respuesta celular y humoral significativamente superior a la de los individuos *naïve*, quienes se sitúan en mayor riesgo de infección. Por tanto, las dosis de refuerzo podrían espaciarse en los sujetos con infecciones por SARS-CoV-2 previas a la vacunación. Por otra parte, los sujetos *naïve* son el grupo que más se beneficia de la administración de una tercera dosis de refuerzo debido al marcado aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes. Finalmente, en este trabajo se demuestra que la cuantificación simultánea de la respuesta celular y humoral proporciona información sobre el pronóstico de la enfermedad y los correlatos de protección tras la infección y/o la vacunación, permitiendo, además, la identificación de perfiles inmunológicos que podrían tenerse en cuenta para personalizar estrategias de vacunación futuras.



# SUMMARY

---



**Introduction:** SARS-CoV-2 infection is responsible for the 2019 coronavirus disease (COVID-19) pandemic, whose broad clinical range varies from asymptomatic infections or mild influenza-like manifestations to life-threatening pneumonias. Severe forms of the disease were promptly associated with demographic characteristics, such as age and male sex, and the presence of comorbidities. In addition, alterations in the immune profile, such as lymphopenia or neutrophilia, an inflammatory predominance with macrophage hyperactivation and cytokine storm, as well as an impaired type I IFN response were described in severe and critically ill patients. However, the information available in 2020 and 2021 on the role of adaptive immunity in acute SARS-CoV-2 infection, its association with varying degrees of COVID-19 severity, and the maintenance of long-term immune memory was limited.

At the same time, vaccination against SARS-CoV-2 proved to be the most effective measure to control the COVID-19 pandemic. Massive vaccination protocols were initiated in December 2020 with Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines encoding a stabilized version of the full-length SARS-CoV-2 spike protein. However, the immune response to these new mRNA-based encapsulated vaccine platforms remained unknown. The published results referred to clinical trials with these vaccines, but the studies in real-world conditions did not exist.

**Objectives:** The general objectives of this work are along two axes: i) to understand how the adaptive immune response develops following natural SARS-CoV-2 infection, its correlation with different degrees of COVID-19 severity, and its long-term maintenance; and ii) to analyze how the adaptive immune response develops following vaccination, its long-term kinetics, its association with protection against breakthrough infections, and the effect of booster doses on pre-existing immunity.

**Results:** Induction of an early SARS-CoV-2-specific cellular response is essential for disease control. Patients who fail to develop a specific T cell response and initiate a humoral response with subsequent production of high antibody levels are not able to effectively control and eliminate the virus and develop severe symptoms. Specifically, the presence of SARS-CoV-2-specific T cells at hospital arrival, before any therapeutical intervention, is an age- and sex-independent protective factor against developing severe COVID-19. Among COVID-19 recovered patients, 97% and 99% maintain, respectively, cellular and humoral response 4 to 7 months after infection, and only a gradual decrease

in antibody levels and their neutralizing activity was observed. In addition, virus-specific memory T cells (predominantly IL2<sup>+</sup>) are detectable in peripheral blood up to 22 months post-symptom onset.

Regarding mRNA vaccination, two doses of Pfizer/BioNTech's BNT162b2 vaccine elicit the parallel and coordinated development of a Th1-driven cellular response and robust antibody production specific against the SARS-CoV-2 spike protein, which peaked 2 weeks after full vaccination. After vaccination, the T cell and IgG peak magnitude is similar in individuals with previous SARS-CoV-2 infection or *naïve* subjects. However, the neutralizing capacity acquired by *naïve* subjects is significantly lower. In both cohorts, the cellular response remains stable between 3 to 6 months, whereas the humoral response significantly and progressively wanes. The maintenance of adaptive response along the months after the two-dose vaccination schedule was significantly higher in SARS-CoV-2 recovered than in *naïve* individuals. This higher decrease of T cells, IgG and neutralizing antibodies in *naïve* individuals associates with breakthrough infections. However, the adaptive immunity boost elicited by vaccination in recovered subjects confers additional protection, even against the Omicron variant. High peak levels of T cells and neutralizing antibodies 15 days post-vaccination associated with protection from breakthrough infections. The main effect of the third booster dose is a 20-fold increase in neutralizing activity in *naïve* individuals and only then neutralizing antibodies titers were comparable to those of recovered subjects.

**Conclusions:** SARS-CoV-2 adaptive immune response dynamics is associated with COVID-19 severity. Early induction of T cell response followed by a controlled humoral response is essential to limit acute infection. Patients who fail to develop T-specific immunity progress to severe disease course and accumulate higher mortality. Moreover, after infection and/or vaccination exclusively the developed cellular memory remains stable. BNT162b2 vaccination enhances adaptive immunity against SARS-CoV-2 in subjects with previous COVID-19. These subjects with hybrid immunity show a significantly higher cellular and humoral response 1 to 6 months post-vaccination than *naïve* individuals, who are at higher risk of infection. Therefore, booster doses could be delayed in subjects with pre-vaccination SARS-CoV-2 infections. *Naïve* individuals were the group who benefited most from the third dose administration, due to the marked increase in neutralizing capacity. These results highlight the relevance of monitoring both cellular and humoral immune responses for disease prognosis and as a correlate for

protection after infection and/or vaccination. In addition, it may help to better identify immunological profiles that could be considered to personalize future vaccination strategies.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Contexto de la pandemia COVID-19

El mundo ha sido testigo de numerosas epidemias y pandemias que han afectado a miles o millones de vidas a lo largo de la historia. A pesar de nuestros avances en medicina e investigación, seguimos enfrentándonos a nuevos patógenos que suponen una amenaza para las vidas humanas, la seguridad económica mundial y el sistema sanitario (1). Ejemplo de ello ha sido la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el virus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2), que fue por primera vez identificado en Wuhan, capital de la provincia de Hubei, en China Central (2,3).

Desde el 8 al 31 de diciembre de 2019, la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan reportó 27 casos de neumonía de etiología desconocida, 7 de ellos graves, en individuos que trabajaban o vivían en las inmediaciones del mercado mayorista local de marisco de Huanan, donde también se vendían animales vivos (4,5). Mediante la secuenciación metagenómica del ácido ribonucleico (ARN) de muestras de lavado broncoalveolar de estos pacientes, el 7 de enero de 2020 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de China identificó como agente causante del brote a un nuevo coronavirus (6-8), cuya secuencia genética fue compartida por las autoridades chinas el 12 de enero (9,10).

El brote de COVID-19 en China alcanzó un pico epidémico en febrero, con un ritmo medio de más de 3.000 nuevos casos confirmados al día (11). La alta eficacia de transmisión del SARS-CoV-2 y la abundancia de viajes internacionales permitieron la rápida propagación mundial de la COVID-19 (12). Finalmente, el 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró oficialmente la situación de pandemia (13).

Desde entonces se han confirmado más de 775 millones de casos de COVID-19 y 7 millones de muertes en todo el mundo (14) causando un gran impacto sanitario, social y económico – se estima que las pérdidas económicas acumuladas hasta 2024 ascenderán a 13,8 billones de dólares (12,15) –.

Concretamente en España, desde el inicio de la pandemia y hasta el último reporte del Instituto de Salud Carlos III en julio de 2023, se han notificado casi 14 millones de casos y 122.057 fallecimientos por COVID-19 (16).

## 2. Características y estructura del SARS-CoV-2

### 2.1. Familia *Coronaviridae*

Dentro del orden de los *Nidovirales* y del suborden de los *Coronavirineae* se encuentra la familia *Coronaviridae*. Los coronavirus se caracterizan por altas tasas de mutación y recombinación génica resultando en una familia altamente heterogénea de virus de ARN monocatenario de sentido positivo con envuelta (17,18). Causan infecciones en humanos, otros mamíferos y especies aviares, incluido el ganado y los animales de compañía, por lo que no sólo suponen un reto para la salud pública, sino también una preocupación veterinaria y económica (19). Concretamente, la subfamilia *Orthocoronavirinae* consta de cuatro géneros: alpha-, beta-, gamma- y delta-coronavirus. Mientras que los dos primeros infectan exclusivamente a especies de mamíferos, los gamma- y delta-coronavirus tienen un abanico de hospedadores más amplio dentro de las especies aviares (17). Estas infecciones, tanto en humanos como en animales, causan principalmente enfermedades respiratorias y entéricas (19).

Hasta la fecha, se han identificado 7 coronavirus humanos (HCoV) diferentes, todos de origen zoonótico (20). Los coronavirus HCoV-229E y HCoV-OC43, circulan desde hace tiempo entre la población y, junto con los más recientemente identificados HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, son responsables de entre el 10 y el 30% de las infecciones estacionales del tracto respiratorio superior – principalmente leves – asociadas a los síntomas del resfriado común (17,21). En cambio, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y el SARS-CoV-2, que han aparecido en la población humana en los últimos 20 años, presentan mayor patogenicidad y pueden originar enfermedades respiratorias graves (22,23). La pandemia causada por el SARS-CoV entre 2002 y 2003, se originó en China y dejó un total de 8.096 casos notificados, incluyendo 774 fallecimientos en 27 países (24). Desde la aparición del MERS en Arabia Saudí en 2012 y hasta finales de 2022 se han notificado 2.600 casos, más del 80% en el país de

origen, y 935 muertes, traducándose en una tasa bruta de mortalidad del 36% (25). Por el contrario, la pandemia COVID-19 ha superado drásticamente estas cifras reportándose casos en 231 países y posicionándose como la crisis sanitaria más importante a la que se ha enfrentado el mundo en los más de 70 años de existencia de la OMS (26).

## 2.2. Origen y transmisión del SARS-CoV-2

Aunque aún no se conoce con exactitud la propagación y el proceso de aparición del SARS-CoV-2, el origen zoonótico del virus está ampliamente aceptado por la comunidad científica (20,27).

Al igual que otros *Betacoronavirus*, incluido el SARS-CoV, las raíces evolutivas del SARS-CoV-2 parecen situarse en los virus que infectan murciélagos (28). Las evidencias actuales sugieren que evolucionó en estos animales dando lugar a un *Sarbecovirus* de murciélago con capacidad replicativa en el tracto respiratorio superior tanto de humanos como de pangolines (29). Concretamente, las fechas de divergencia entre el SARS-CoV-2 y el reservorio de *Sarbecovirus* de murciélago se estiman entre 1948 y 1982, por lo que probablemente el linaje que dio origen al SARS-CoV-2 ha estado circulando desapercibido en estos animales durante décadas (27).

Recientemente, en una cueva de murciélagos de la provincia China de Yunnan se ha caracterizado un virus, RaTG13, que exhibe una identidad de secuencia del 96,2% con el SARS-CoV-2 (30). También se han identificado coronavirus de pangolín que muestran una similitud de secuencia del 85,5-92,4% (31,32). A pesar de que ninguno de estos virus puede ser el ancestro directo del SARS-CoV-2 – requeriría una homología superior al 99% – la creciente identificación de nuevos coronavirus en animales salvajes apoya el origen zoonótico del virus (29,33,34). Probablemente, un muestreo mejorado en una región geográfica más amplia, incluyendo la mayor parte del Sudeste Asiático, permitiría la identificación de virus más estrechamente relacionados (34,35).

Otra cuestión evolutiva que queda pendiente es el posible papel de las especies reservorio. Aunque no se ha descartado plenamente una zoonosis directa, la introducción a través de un hospedador intermediario vendido en el mercado de Huanan parece más plausible (20,36). A pesar de que se detectó SARS-CoV-2 en muestras ambientales de este mercado (36) – principalmente en la sección que comerciaba con animales salvajes

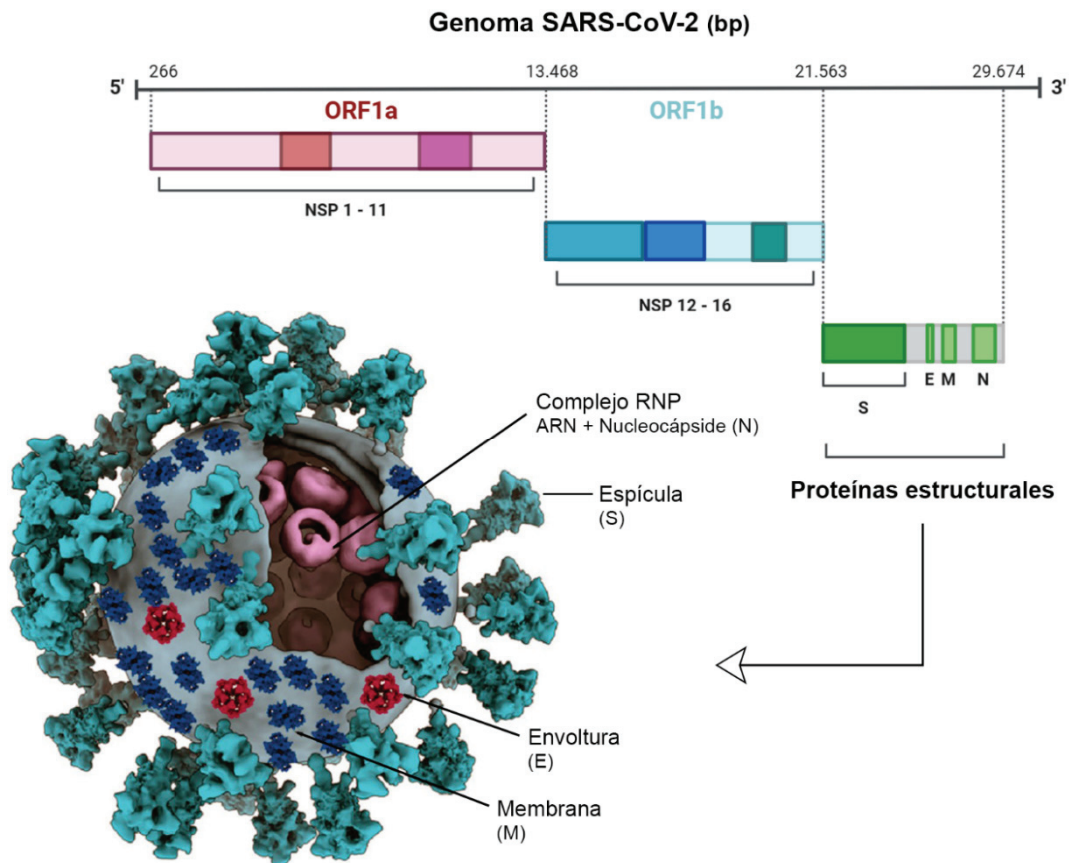
y domésticos, así como en las zonas de drenaje asociadas – las pruebas en animales fueron negativas. No obstante, el muestreo realizado pudo no ser representativo de la diversidad animal existente en el mercado ya que no incluía perros mapache u otras especies conocidas por su alta susceptibilidad al SARS-CoV-2 (37).

La transmisión del SARS-CoV-2 ocurre por vía aérea mediante: i) la propagación de grandes gotitas respiratorias – producidas en la tos y los estornudos de individuos infectados – que se depositan en las membranas mucosas de ojos, nariz o boca de posibles huéspedes (transmisión por gotitas) o que se depositan en superficies que posteriormente serán tocadas por posibles huéspedes y transferidas a sus membranas mucosas (transmisión por fómites) (38,39); y ii) la inhalación de aerosoles infecciosos – partículas microscópicas líquidas, sólidas o semisólidas tan pequeñas que permanecen suspendidas en el aire – y son producidos durante todas las actividades respiratorias, tales como respirar o hablar (40,41). Se estima que el SARS-CoV-2 en aerosol tiene una semivida de entre 1 y 3 horas (42,43). Ésta es considerada por la OMS y los CDC estadounidenses como la principal vía de propagación del virus a corta y larga distancia (44,45).

## **2.3. Ciclo viral del SARS-CoV-2**

### **2.3.1. Entrada viral**

El genoma del SARS-CoV-2 tiene un tamaño cercano a los 30 kb, contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORF) y codifica 29 proteínas (46), de las cuales destacan 4 proteínas estructurales y 16 proteínas no estructurales (nsp1-nsp16) (47). Al igual que en otros coronavirus, la proteína de la espícula (S) del SARS-CoV-2 es un homotrímero transmembrana fuertemente glicosilado que sobresale del virión y decora ampliamente la superficie vírica como una corona (48,49) (**Figura 1**). Consta de dos subunidades funcionales responsables de mediar la unión al receptor de la célula huésped (S1) y de la fusión de las membranas viral y celular (S2). Estas subunidades permanecen unidas de forma no covalente en la conformación de prefusión (50,51).



**Figura 1. Modelo tridimensional de una partícula de SARS-CoV-2 y anotación de su genoma.** Se muestran las proteínas estructurales de la espiga (S), la membrana (M), la envoltura (E) y la nucleocápside (N) y el complejo protector de ribonucleoproteína (RNP) – derivado de la unión del ARN y la proteína N –, codificados por ORFs del extremo 3'. Las 16 proteínas no estructurales (nsp) del virus son el resultado de la traducción del ORF1a y ORF1b.

ORF: Marco abierto de lectura; bp: Pares de bases.

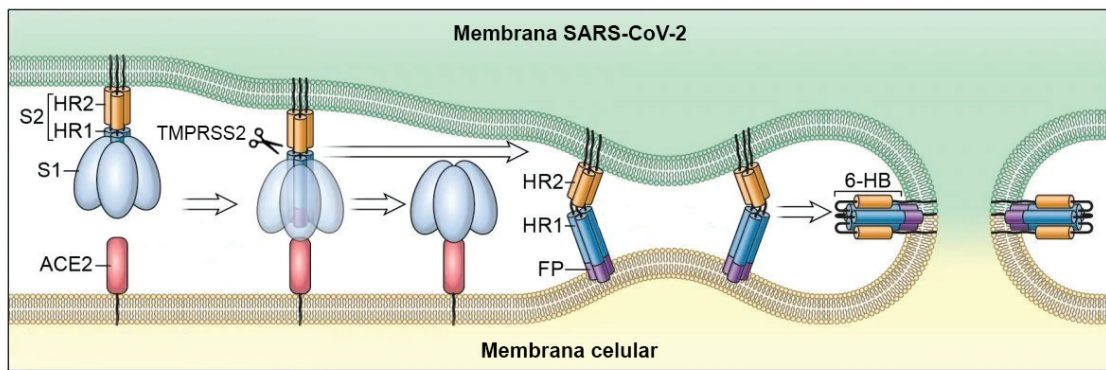
Adaptada de Saville JW, *et al.* Chem Rev. 2022 (52) y Gordon DE, *et al.* Nature. 2020 (53).

Al igual que para el SARS-CoV (54,55), el receptor de la célula diana del SARS-CoV-2 es la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2) (56,57), una exopeptidasa de membrana presente principalmente en células alveolares de pulmón (58), aunque también se expresa en enterocitos, túbulos renales, vesícula biliar, cardiomiocitos, células reproductoras masculinas, trofoblastos placentarios, células ductales, ojo y vasculatura (59,60). La actividad catalítica de ACE2 afecta a tres vías cardiovasculares centrales –

los sistemas renina-angiotensina, calicreína-cinina y apelina – aunque su principal función es la hidrólisis de la angiotensina I (Ang I) y la Ang II formando Ang-(1-9) y Ang-(1-7), respectivamente, que promueven la vasodilatación e inhiben la fibrosis y la inflamación (61).

En ambos coronavirus, ACE2 es reconocida a través del dominio de unión al receptor (RBD), una región de 211 aminoácidos, situado en el extremo C-terminal de S1 (56,62). Concretamente, son 6 los aminoácidos del RBD que conforman el motivo de unión al receptor (RBM) mediando la unión directa de la proteína S a ACE2 (63,64). Sin embargo, los aminoácidos en 5 de estas 6 posiciones difieren entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 – Tyr455Leu, Leu486Phe, Asn493Gln, Asp494Ser y Thr501Asn – (28,65), permitiendo que éste último muestre una mayor avidez por el receptor ACE2 (62,66,67), lo que podría explicar, al menos en parte, su mayor transmisibilidad.

La entrada del SARS-CoV-2 al interior de la célula diana requiere el procesamiento proteolítico de la proteína S por parte de proteasas del huésped (68). Tras la unión RBD-ACE2, tiene lugar un primer corte en el límite S1/S2 – que alberga un sitio de escisión de furina – llevado a cabo por la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) del huésped, donde también son clave otros cofactores como la neurofilina-1 (NRP1) o la furina (68-71). Esta escisión permite el desacoplamiento de ambas subunidades y el plegamiento de S2 para exponer un segundo sitio de escisión (S2') (48). En este punto, la entrada a la célula puede desencadenarse mediante: i) la escisión en S2' que conduce a la liberación del péptido de fusión (FP) y a la aproximación gradual de las regiones heptadas HR1 y HR2 para formar un poro de seis hélices (6-HB), que induce la fusión directa de la envoltura vírica y la membrana de la célula huésped permitiendo la liberación del ARN viral al citosol (50,68,71) (**Figura 2**); o ii) mediante la endocitosis mediada por clatrina de la partícula viral completa. En este caso, la posterior fusión de las membranas endosomal y viral tiene lugar tras la escisión en S2' por catepsinas del huésped (17,61) liberando el ARN viral al citosol. La liberación del genoma viral marca el comienzo de un complejo programa de expresión de genes virales altamente regulado (17).



**Figura 2. Esquema de la entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped.** La proteína S se une al receptor ACE2 y el virus se adhiere a la célula. Posteriormente, la proteína S es escindida por TMPRSS2 dando lugar a las subunidades S1 y S2 y liberando el péptido de fusión (FP). En S2, HR1 y HR2 se aproximan gradualmente y forman un haz de seis hélices (6-HB) que provoca la fusión completa de las bicapas del virus y la membrana de la célula huésped.

ACE2: Enzima Convertidora de Angiotensina tipo 2; TMPRSS2: proteasa transmembrana de serina; HR: Repetición Heptada.

Adaptada de Zhang Q, *et al.* Signal Transduct Target Ther. 2021 (72).

### 2.3.2. Síntesis y traducción de ARN

Tras la liberación del ARN al citosol de la célula diana, tiene lugar la traducción inmediata del ORF1a y el ORF1b, generándose dos poliproteínas superpuestas de gran tamaño: pp1a y pp1ab. Estas dos poliproteínas son escindidas por proteasas virales para generar las 16 nsp que desempeñan un papel crucial en la replicación y transcripción viral (17,46). Las cuatro primeras (nsp 1-4) son escindidas por una proteasa de tipo papaína ( $PL^{pro}$ ) (73,74) y las restantes (nsp 5-16) son escindidas por la principal proteasa viral, una proteasa de tipo 3C ( $3CL^{pro}$ , también conocida como  $M^{pro}$ ) (75).

Paralelamente, y como resultado de la modificación de las membranas celulares del huésped, se produce la biogénesis perinuclear de vesículas de doble membrana (DMV) que constituyen un microambiente protector idóneo para la replicación y síntesis del ARN viral (76,77). La formación de DMV es inducida principalmente por la acción combinada de nsp3, nsp4 y nsp6 (52,78). En el interior de las DMV, otras nsp se ensamblan formando los complejos de replicación y transcripción (RTC) (Figura 3). Antes de la síntesis del

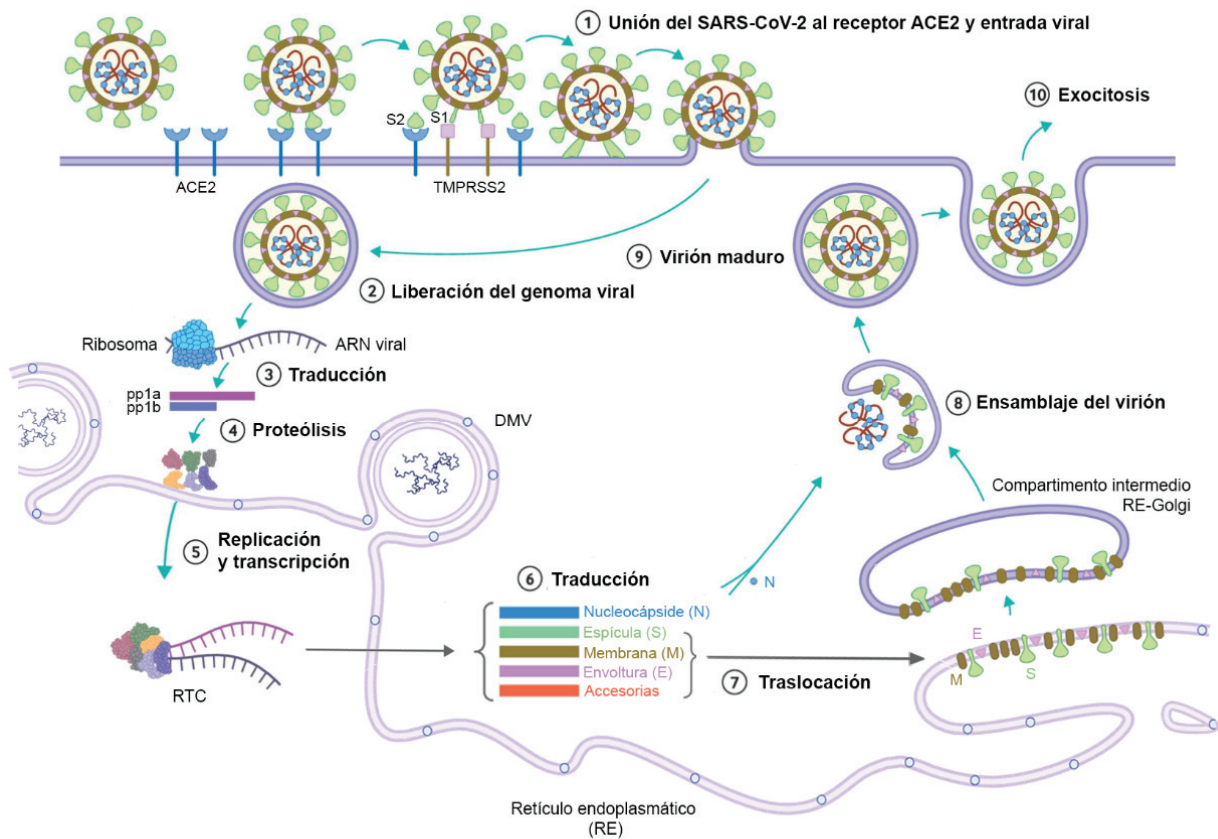
ARN mensajero (ARNm), nsp12 – una ARN polimerasa dependiente de ARN – interactúa con los cofactores nsp7 y nsp8 para formar el RTC central (C-RTC) (52,79). A continuación, y para guiar la síntesis del dúplex de ARN, dos helicasas nsp13 son reclutadas al C-RTC estableciéndose así el RTC de elongación (E-RTC) (79,80). El procesamiento final de los ARNm virales implica la adición de un casquete 5' (cap-5') que contribuye a la estabilidad del ARNm viral, el inicio de la traducción y el escape del sistema inmunitario innato del huésped (52,81). En este proceso participan nsp10, que funciona como cofactor, nsp13, que proporciona la actividad 5'-trifosfatasa, y nsp14 y nsp16, que desempeñan funciones metiltransferasas (52,79,81). Tras el cap-5', los ARNm actúan como plantillas para la traducción de proteínas virales, para ello la acción conjunta de nsp3, nsp4 y nsp6 genera un poro hexamérico en forma de anillo en las DMV a través del cual se exporta el ARNm al citosol para su traducción (82).

Al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV-2 secuestra la maquinaria de traducción del huésped para sus propios transcritos (83-85). Por una parte, nsp1 restringe la traducción global de los ARNs celulares al unirse directamente a la subunidad 40S del ribosoma y bloquear el canal de entrada del ARNm (86,87). Sin embargo, la traducción viral se mantiene gracias al reconocimiento por parte de nsp1 de una secuencia específica (SL1) en el extremo 5' UTR de los ARNm virales que conduce a la liberación del canal ribosomal (88). Por otra parte, nsp1 induce el corte endonucleolítico y la posterior degradación únicamente de los ARNm citosólicos del huésped (89,90), ya que la secuencia 5' líder de los ARN virales proporciona protección frente a esta degradación inducida por nsp1 (87). Además, la interrupción de la traducción obstaculiza la respuesta del sistema inmunitario innato del huésped que depende de la traducción de factores de defensa antivirales como el interferón (IFN) o el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I) (91,92) (véase apartado 4.3.1.). De esta forma, nsp1 es un factor de virulencia clave en la evasión inmunitaria del SARS-CoV-2 (93,94).

Otro aspecto importante relacionado con el RTC es su mecanismo de corrección de errores. La mayoría de los virus de ARN se replican con altas tasas de error (95). Sin embargo, el SARS-CoV-2 codifica para nsp14 – una exonucleasa con actividad de corrección de pruebas – que le permite mantener una alta fidelidad durante la replicación de su genoma (46,96).

### 2.3.3. Proteínas estructurales y ensamblaje del virión

Cuatro ORF del extremo 3' del genoma viral codifican un conjunto canónico de proteínas estructurales que incluyen la nucleocápside (N), la proteína de la espícula (S), la proteína de la membrana (M) y la proteína de la envoltura (E) (46). Una vez traducidas, estas proteínas se translocan a las membranas del retículo endoplasmático (RE) y transitan a través del compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), donde se ensamblan y contribuyen a la gemación de nuevos viriones que son secretados por exocitosis (17,77). En primer lugar, antes de ser encapsulado por la envoltura vírica, el genoma del SARS-CoV-2 debe ser fuertemente condensado. Este empaquetamiento está mediado por la unión del ARN y la proteína N, formando el complejo protector de ribonucleoproteína (RNP) (52,97). Este complejo RNP se retiene en el lado citoplasmático del ERGIC, donde interactúa con la proteína M para ser encapsulado (77). La oligomerización y la asociación de la proteína M con el complejo RNP y posteriormente con las proteínas S – impulsa el ensamblaje – y E – promueve la curvatura de la membrana – conduce a la liberación de las partículas virales maduras mediante exocitosis lisosomal (52,98), previa desacidificación e inactivación de las proteasas lisosomales, para iniciar una nueva ronda de infección (52,77,99) (**Figura 3**).



**Figura 3. Ciclo de infección del SARS-CoV-2.** Para entrar en la célula huésped, la proteína S interactúa con el receptor ACE2, al tiempo que es escindida por proteasas del huésped, como TMPRSS2, activando su capacidad de fusión con la membrana. En el citoplasma, el ARN vírico es traducido por la maquinaria de traducción del huésped originando dos poliproteínas (pp1a y pp1b) que son cotraduccionalmente escindidas en 16 proteínas no estructurales (nsp). Las nsp inducen la formación de las vesículas de doble membrana (DMV) y el ensamblaje de los complejos de replicación y transcripción (RTC). Una vez sintetizados en el interior de las DMV, los ARNm son exportados al citosol para su traducción, donde actúan como plantillas para la síntesis de las proteínas virales. Las proteínas estructurales S, M y E son translocadas a las membranas del RE y transitan a través del compartimento intermedio RE-Golgi, donde interactúan con el ARN viral fuertemente condensado por la proteína N, y contribuyen al ensamblaje de nuevos viriones. Finalmente, los viriones son secretados de la célula infectada por exocitosis.

Adaptada de Cevik M, *et al.* BMJ. 2020 (100).

Además de su función en la replicación y ensamblaje de los viriones, las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 interfieren en la respuesta inmunitaria y la patogénesis del huésped (46). La proteína E puede funcionar como un canal iónico, bombeando  $\text{Ca}^{2+}$  fuera del RE, lo que contribuye a la activación del inflamasoma celular, potenciando la sobreproducción de interleuquina (IL)-1 $\beta$  y la inmunopatogénesis de la infección (101). Por otro lado, la proteína N contrarresta las actividades antivirales celulares mediadas por ARN de interferencia (ARNi) (102) y es un potente antagonista de la vía del IFN ya que impide el reconocimiento del ARN viral por parte de RIG-I (103,104) e inhibe la activación de la vía JAK (Janus quinasa)-STAT (Transductor de Señal y Activador de Transcripción) impidiendo así la expresión de un conjunto de genes estimulados por interferón (ISG) (105). De forma similar, la proteína M también antagoniza la producción de IFN de tipo I y III bloqueando la señalización RIG-I/MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma) (106).

Por otra parte, en los casos graves de COVID-19 se han reportado lesiones pulmonares extensas asociadas a la presencia de neumocitos sincitiales multinucleados e infectados (107,108). La expresión de la proteína S en la superficie de células infectadas por SARS-CoV-2 media la fusión de éstas con células vecinas ACE2-positivas facilitando la diseminación viral, la citopatía, la evasión inmunitaria y la respuesta inflamatoria (109,110).

## 2.4. Variantes de interés de SARS-CoV-2

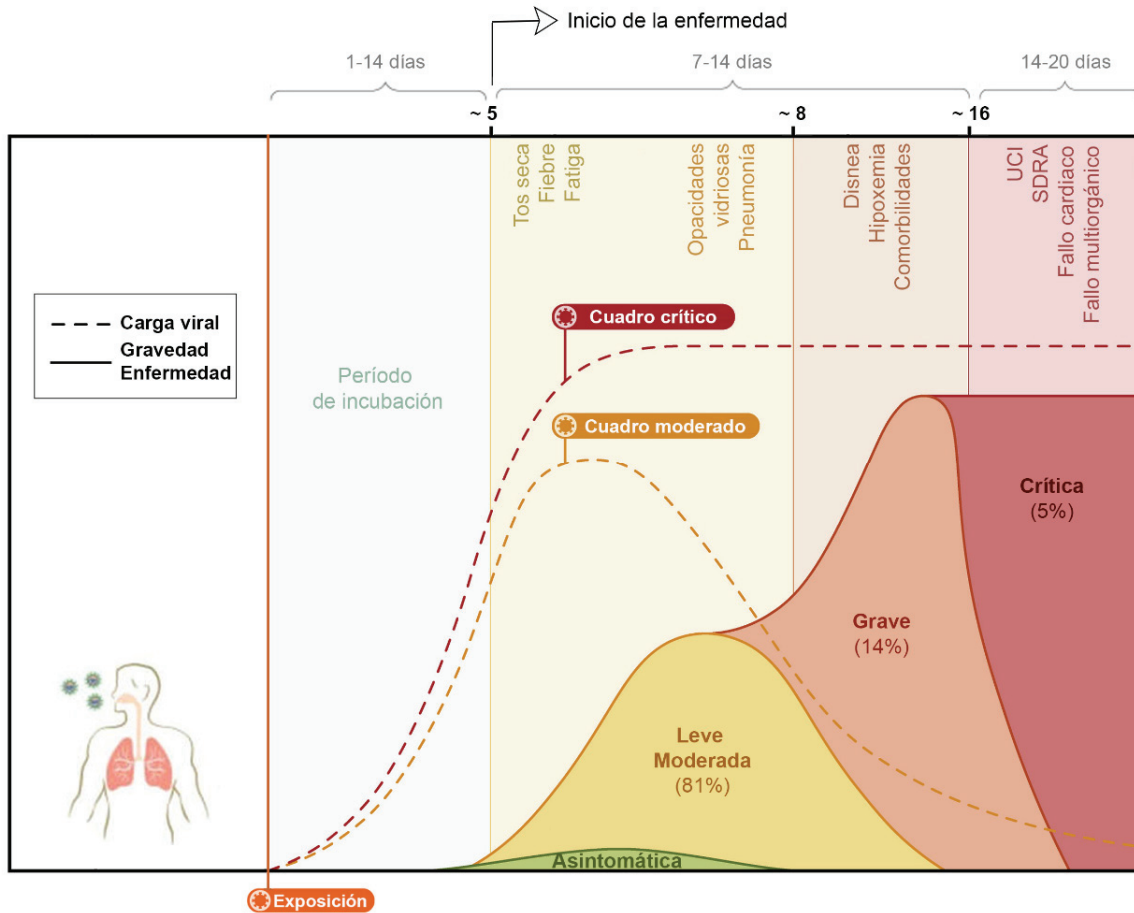
El análisis filogenético de los linajes de SARS-CoV-2 durante los primeros meses de la pandemia reveló mutaciones limitadas (111,112). Exclusivamente se identificó el cambio de ácido aspártico por glicina en la posición 614 de la proteína S – mejora la afinidad de unión al ACE2 aumentando la transmisibilidad – como la única mutación consensuada en este periodo (113,114). Los primeros linajes divergentes de SARS-CoV-2 tardaron 8 meses en aparecer y surgieron de forma independiente en distintas partes del mundo (111). En noviembre de 2020, la aparición de la variante Alfa (B.1.1.7) en Reino Unido (115,116) fue seguida rápidamente por la aparición de las variantes Beta (B.1.351) en Sudáfrica (117), Gamma (P.1) en Brasil (118), y Delta (B.1.617.2) en India (119). Estas variantes fueron clasificadas como variantes preocupantes (VoC) por la OMS, demostrando: i) una mayor transmisibilidad o cambios perjudiciales en la epidemiología

de la COVID-19, ii) una mayor virulencia o cambios en la presentación clínica de la enfermedad asociada y/o iii) un menor rendimiento de las vacunas, los agentes terapéuticos, las herramientas de diagnóstico u otras medidas sociales y de salud pública (120).

El descubrimiento de Ómicron, la quinta VoC, en Sudáfrica a finales de noviembre de 2021 (121) marcó el inicio de una nueva fase de la pandemia que, a diferencia de la anterior marcada por la aparición de linajes altamente divergentes, estuvo dominada por sucesivos barridos de sublinajes de Ómicron (122). Ómicron – que comprende los sublinajes BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5 – presenta 37 mutaciones diferentes sólo en la proteína S, 15 de ellas en el RBD (123,124), que le confieren una mayor transmisibilidad y capacidad de escape inmunitario (125-127). Con un ritmo de crecimiento superior (128), BA.5 se impuso finalmente como linaje dominante a nivel global desde su aparición (122).

### **3. Espectro clínico de la COVID-19 y factores de riesgo de las formas graves**

Tras la infección, la mayoría de las personas muestran signos de la enfermedad tras un periodo de incubación de aproximadamente 5 días, aunque éste puede oscilar entre 1 y 14 días (4). El espectro clínico varía desde la infección asintomática o la manifestación leve – caracterizada por fiebre, tos seca y fatiga – hasta la enfermedad grave con lesión pulmonar, fallo multiorgánico y muerte (129,130). Aproximadamente el 14% de los casos evoluciona a formas graves, comúnmente en adultos mayores de 60 años o individuos con comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión o enfermedad coronaria (4,131). De ellos, hasta un 5% progresa a un estado crítico presentando insuficiencia respiratoria, shock séptico y/o fallo multiorgánico (132). Por el contrario, los casos asintomáticos representan entre un 20 y un 40% de las infecciones reportadas por SARS-CoV-2 (133,134) (**Figura 4**).



**Figura 4. Dinámica y sintomatología de la infección por SARS-CoV-2.** Tras la exposición inicial, el periodo de incubación medio es de 5 días. Mientras que en la mayoría de los casos la respuesta inmunitaria inicial del huésped es capaz de controlar la infección y evoluciona de forma leve o moderada – siendo la sintomatología más común fiebre, tos seca y fatiga –, alrededor de un 14% de los pacientes sintomáticos desarrolla cuadros graves de la enfermedad. De ellos, hasta un 5% progresa a un estado crítico caracterizado por una replicación viral descontrolada, insuficiencia respiratoria y/o fallo multiorgánico. Las formas graves suelen aparecer en torno al día 8 tras el comienzo de los síntomas y la enfermedad crítica y muerte se producen aproximadamente a los 16 días. En las infecciones leves y moderadas, la carga viral alcanza su máximo en la primera semana de la infección, posteriormente disminuye de forma gradual.

Adaptada de Hu B, *et al.* Nat Rev Microbiol. 2022 (11) y Corti D, *et al.* Cell. 2021 (135).

A pesar de que la expresión de ACE2, el receptor de la célula diana del SARS-CoV-2, se circunscribe principalmente a las células alveolares de pulmón (58), su ubicuidad en el organismo respalda la aparición tanto de manifestaciones pulmonares como extrapulmonares, propiciando formas de enfermedad sistémica (136-138).

### **3.1. Manifestaciones respiratorias**

Más del 80% de los casos de COVID-19 suelen afectar a las vías respiratorias superiores y cursar como formas clínicas leves (4,139) caracterizadas por presentar fiebre, tos seca, dificultad respiratoria, congestión nasal, rinorrea, mialgia y cefalea (11,130). Desafortunadamente, entre el 15 y el 20% de los pacientes desarrolla infiltrados pulmonares (140). En los pacientes con neumonía, los patrones más frecuentes observados en los estudios de tomografía computarizada (TC) de tórax son opacidades en forma de vidrio deslustrado y sombreado irregular (2,130). La enfermedad grave – aproximadamente el 14% de los casos de COVID-19 – suele comenzar 1 semana después del inicio de los síntomas (141), presentándose en forma de disnea e hipoxemia, que entre el 6 y el 30% de los casos requiere ventilación en una unidad de cuidados intensivos (UCI) (59,139,142,143). Estos pacientes pueden progresar y desarrollar síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (141), que se define como la aparición aguda de infiltrados bilaterales, hipoxemia grave y edema pulmonar que no se explica totalmente por insuficiencia cardíaca o sobrecarga de líquidos (144). El SDRA se considera la principal causa de muerte en los pacientes con COVID-19 (2,145). El fallecimiento sobreviene aproximadamente a los 16 días tras el inicio de los síntomas (11), reportándose una tasa global de letalidad de ~1% (139,146). Las autopsias de estos individuos muestran daño alveolar difuso con infiltración perivascular de células T, lesión endotelial grave asociada a la presencia de virus intracelular y trombosis generalizada con microangiopatía (147,148).

En los pacientes con COVID-19 el daño pulmonar grave subyacente al SDRA puede atribuirse a la elevada expresión de ACE2 en el tejido, principalmente en las células epiteliales de tipo II encargadas de la producción de surfactante (58). La infección por SARS-CoV-2 puede conducir a la muerte de estas células, la consiguiente reducción de los niveles de surfactante pulmonar y el colapso de los alveolos pulmonares (140,149). Paralelamente, se ha descrito que la muerte o el daño de las células alveolares conduce a

un desequilibrio entre la activación de la coagulación y la inhibición de la fibrinólisis que da lugar a la formación de membranas hialinas que sellan los alvéolos frente a la acumulación de líquido y limitan el intercambio de oxígeno (22,150). Por otro lado, la tormenta de citoquinas – una respuesta hiperinmune a la infección que provoca la liberación masiva de citoquinas proinflamatorias (véase apartado 4.4.) – también puede contribuir a la destrucción del epitelio alveolar (107,151).

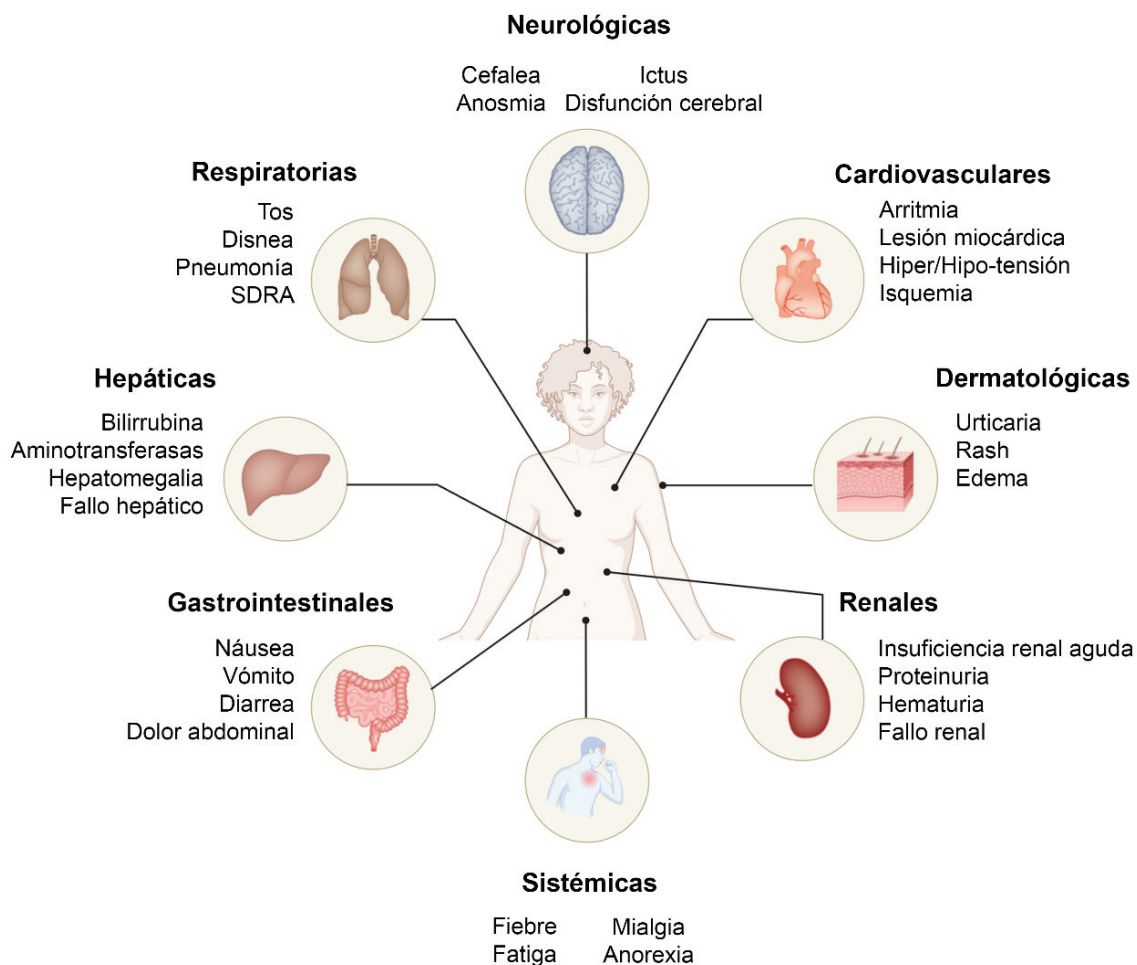
### 3.2. Manifestaciones extrapulmonares

Aunque el sistema respiratorio es la principal diana del SARS-CoV-2, también pueden verse afectados otros sistemas como el cardiovascular, el gastrointestinal, el renal o el nervioso (2,141) (**Figura 5**).

En pacientes con COVID-19 la afectación cardiovascular es frecuente, especialmente en las formas graves (2). La lesión miocárdica con niveles elevados de troponina se describe aproximadamente en el 25% de los casos graves, dando lugar a disfunción cardíaca y arritmias (152). Es probable que la patogénesis de la lesión miocárdica se deba a una combinación de mecanismos como el daño mediado por citoquinas, el desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno, la lesión isquémica por formación de trombos microvasculares, la invasión vírica del miocardio y la desregulación del sistema renina-angiotensina (153-155). Asimismo, se han reportado hiper- e hipo-tensión, palpitaciones y cardiomiopatías en estos pacientes (156).

El intestino también puede ser infectado por el SARS-CoV-2 (157,158). La prevalencia de síntomas gastrointestinales – asociada principalmente a formas no graves – es del 30-50%, siendo la sintomatología más frecuente la falta de apetito, diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (159,160). Además, los pacientes graves parecen presentar tasas más elevadas de disfunción hepática que los leves (161,162). Concretamente, se ha notificado elevación de las aminotransferasas (130,159), hipoproteinemia y prolongación del tiempo de protrombina (163). Las manifestaciones gastrointestinales y hepáticas pueden deberse a la replicación directa del virus en los enterocitos – que expresan más ACE2 que las células respiratorias – (22) y hepatocitos o colangiocitos (161) o bien, a la inflamación inmunomediada por la tormenta de citoquinas (161,164).

Además, el SARS-CoV-2 es un virus neurotrópico y ha sido detectado en cerebro mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunohistoquímica (165,166). Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que se encuentra principalmente en células vasculares e inmunitarias en lugar de infectar directamente neuronas (165,167). La anosmia, la cefalea, la disfunción cerebral y el ictus son los síndromes neurológicos más comunes asociados a la infección por SARS-CoV-2 (166,168). La anosmia – pérdida de olfato sin bloqueo agudo del flujo de aire –, y la asociada disgeusia, es el síntoma neurológico más frecuente en la COVID-19 leve (169,170) y, aunque no se conoce bien su prevalencia, los estudios de cohortes más amplios han informado de hasta un 11% (171). Se debe predominantemente a la infección de células sustentaculares del epitelio y el bulbo olfatorio, lo que encaja con la distribución observada del receptor de entrada ACE2, y provoca inflamación local y disfunción neuronal (169,172,173). La disfunción cerebral aguda que da lugar a alteraciones de la conciencia o la cognición debidas a la COVID-19 se define de forma variable según los estudios, y puede incluir entidades como coma, delirio, encefalopatía, confusión, somnolencia o estupor (168). Su incidencia oscila entre el 7 y 14% (174,175), aunque en pacientes en estado crítico las incidencias de coma (81,6%) y delirio (55%) son mucho mayores (176). Esta clínica puede estar causada por mecanismos microvasculares e inflamatorios secundarios a la infección sistémica por SARS-CoV-2 (177,178). El ictus se ha reportado entre el 2 y el 6% de los pacientes hospitalizados por COVID-19 (179,180). Con frecuencia estos pacientes presentan eventos vasculares en el contexto proinflamatorio causado por la infección que conduce a un estado de hipercoagulación con elevación de proteína C reactiva, dímero D y ferritina (181,182). Además, la formación de membranas hialinas como consecuencia del desequilibrio entre coagulación y fibrinólisis (22,150), induce la formación de trombos de fibrina en los vasos arteriales pequeños de la mayoría de los casos graves de COVID-19 (183,184). Este estado también está favorecido por el proceso de inmunotrombosis en el que los neutrófilos y monocitos activados interactúan con las plaquetas y la cascada de coagulación originando coágulos intravasculares con el objetivo de bloquear agentes patógenos y limitar su propagación (185). Sin embargo, el estado hiperinflamatorio generado por la infección por SARS-CoV-2 desregula este proceso favoreciendo la formación de microtrombos (186,187).



**Figura 5. Principales manifestaciones clínicas de la COVID-19.** Aunque el sistema respiratorio es la principal diana, la infección por SARS-CoV-2 puede causar daños en otros tejidos. En la figura se resumen las manifestaciones respiratorias y extrapulmonares más comunes de la COVID-19.

Adaptada de Gupta A, *et al.* Nat Med. 2020 (188).

### 3.3. Factores de riesgo y biomarcadores de la COVID-19 grave

Una característica notable de la infección por SARS-CoV-2 es la drástica variabilidad clínica entre los individuos infectados. Al margen de las variaciones en la respuesta inmune (189,190) (detalladas en el apartado 4.4.), se han identificado distintos factores de riesgo y biomarcadores de la progresión de la COVID-19 hacia una fase grave y crítica. Los factores de riesgo incluyen aspectos demográficos, como la edad (139,191), el sexo (130,192) y la etnia (193,194), y comorbilidades (194,195). Además, valores

aumentados en ciertos parámetros de laboratorio, como la lactato deshidrogenasa, procalcitonina, proteína C reactiva o citoquinas proinflamatorias, se han usado en la práctica clínica como biomarcadores de la COVID-19 que progresa hacia la gravedad (196).

Al igual que con otras enfermedades infecciosas, las personas mayores de 70 años – como grupo de población vulnerable que suele presentar más comorbilidades (197), un estado proinflamatorio crónico del sistema inmunitario relacionado con el envejecimiento y una defensa inmunitaria más débil frente a enfermedades infecciosas (198) – tienen mayor probabilidad de contraer COVID-19 (199) y hasta 5 veces más probabilidades de morir tras desarrollar síntomas (200).

Asimismo, se ha reportado un mayor riesgo de infección, gravedad de la enfermedad, ingreso en UCI y muerte en hombres (195,201). Aunque se han propuesto diversos mecanismos para explicar esta disparidad en los resultados clínicos de la COVID-19 entre hombres y mujeres, sigue habiendo controversia sobre el impacto del sexo en el curso clínico de la enfermedad (202). Se ha sugerido que los niveles más altos de andrógenos en hombres pueden aumentar la expresión del receptor ACE2 y la proteasa TMPRSS2, facilitando la entrada del virus (202,203). De igual forma, las hormonas sexuales pueden jugar un papel diferencial en los procesos inflamatorios y la respuesta inmunitaria (204). Concretamente en la infección por SARS-CoV-2 se han descrito diferencias clave en las capacidades inmunitarias basales de hombres y mujeres, con niveles más altos de citoquinas proinflamatorias y menor activación de células T en los pacientes varones (192).

Paralelamente, la presencia de comorbilidades preexistentes como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, enfermedades hepáticas, diabetes, afecciones respiratorias, cáncer y obesidad grave se ha asociado con un mayor riesgo de mortalidad en la COVID-19 (205-207).

También se han identificado correlaciones significativas entre la gravedad o mortalidad de la COVID-19 y distintos parámetros de laboratorio. Se han descrito: i) cambios en los recuentos de células sanguíneas, como la disminución del número de linfocitos y eosinófilos, el aumento del cociente neutrófilo-linfocito o la leucocitosis (130,208,209); ii) aumentos en los niveles de algunos parámetros bioquímicos, como

lactato deshidrogenasa, proteína C reactiva, procalcitonina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa o nitrógeno ureico en sangre (130,131,208); y iii) cambios en los indicadores de coagulación, como la disminución del recuento de plaquetas, aumento del dímero D y fibrinógeno o la prolongación del tiempo de protrombina (59,181,182).

## 4. Respuesta antiviral del Sistema Inmunitario

La defensa frente a patógenos está mediada por las respuestas secuenciales y coordinadas que se denominan inmunidad innata y adaptativa (210,211). Contra los virus, estas respuestas pretenden bloquear la infección y eliminar las células infectadas (211). Sin embargo, de no producirse una respuesta fuertemente coordinada, la actividad del sistema inmunitario puede llegar a ser deletérea favoreciendo la diseminación de la infección (212).

### 4.1. Inmunidad Innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a las infecciones, está mediada por mecanismos celulares y bioquímicos que existen incluso antes de la infección, permitiendo así el desarrollo de rápidas respuestas (213,214). Los principales componentes de la inmunidad innata son: i) barreras físicas y químicas, como la piel y las superficies mucosas; ii) células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos), células dendríticas (DC), linfocitos Natural Killer (NK), células linfocíticas innatas (ILC) y mastocitos; y iii) proteínas sanguíneas, como el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación (211).

Los componentes del sistema innato reconocen estructuras moleculares, con frecuencia compartidas entre distintos microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y moléculas endógenas producidas por células dañadas o en proceso de muerte llamadas patrones moleculares asociados a daño o lesión (DAMP) (215). Estas secuencias son reconocidas por receptores para el reconocimiento de patrones (PRR) entre los que destacan los receptores tipo *toll* (TLR) y NOD (NLR) – reconocen componentes de la pared bacteriana y ácidos nucleicos –, los receptores tipo RIG (RLR) – detectan ARN vírico – o los detectores citosólicos de ácido desoxirribonucleico (ADN) denominados CDS (215,216).

La estimulación de los PRR induce la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y AP-1 (proteína activadora 1) que promueven la expresión tanto de citoquinas – TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1 e IL-6, entre otras – y otras moléculas proinflamatorias, como de los genes de interferón tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) que bloquean las infecciones víricas (211). Además, la respuesta innata proporciona señales que activan e influyen en la naturaleza de las respuestas inmunitarias adaptativas (211,217).

## 4.2. Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa se caracteriza por orquestar respuestas antígeno específicas mediadas por células de estirpe linfoide, los linfocitos. Éstos pueden reconocer entre  $10^7$  y  $10^9$  determinantes antigénicos diferentes gracias a la recombinación somática que sufren sus receptores de antígeno (211,218). Estas respuestas específicas generan memoria lo que permite responder de forma más rápida, con mayor magnitud y superior eficacia a la exposición repetida a un antígeno (211,219).

En función del origen y el tipo de patógeno, la inmunidad adaptativa desarrolla mecanismos efectores celulares o humorales. La respuesta adaptativa celular está mediada por linfocitos T y se polariza en: i) linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos que matan – liberando granzimas y perforinas – a las células infectadas que expresan péptidos derivados de patógenos intracelulares, como los virus, que se presentan asociados a moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); y ii) linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores o *helper* (Th) que reconocen péptidos procedentes de microorganismos extracelulares unidos a moléculas de clase II del MHC y secretan citoquinas que actúan sobre otros linfocitos T, linfocitos B – promoviendo la producción de anticuerpos – y macrófagos – activando la fagocitosis –. Por otro lado, la respuesta adaptativa humoral está mediada por linfocitos B y sus productos secretados, los anticuerpos, que neutralizan la infectividad de los microorganismos y promueven su eliminación por los fagocitos y la activación del sistema del complemento (211,218,219).

### 4.3. Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2

#### 4.3.1. Inmunidad Innata en la COVID-19

Los principales PRR implicados en el reconocimiento del SARS-CoV-2 – encargados de la detección de ARN vírico intracelular – se encuentran en las células epiteliales, las células dendríticas y los macrófagos. Son los receptores citosólicos RIG-I y MDA5 y los receptores de membrana TLR3 y TLR7 presentes en el RE y endosomas (220-224). Al unirse al ARN, RIG-I y MDA5 son transportados a la membrana mitocondrial externa por la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) (225), lo que conduce al reclutamiento de ubiquitín ligasas y serín/treonina quininas que coordinan la activación de los factores reguladores del interferón (IRF) – IRF3 e IRF7 – y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que inducen la producción de IFN tipo I (226-229). De forma similar, el reconocimiento del ARN vírico por los TLR inicia el reclutamiento de las proteínas adaptadoras MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88) para TLR7 y TRIF (proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón- $\beta$ ) para TLR3 que desencadenan la activación de NF- $\kappa$ B e IRF3, respectivamente (230,231) (véase apartado 4.5).

Los IFN tipo I son una familia de citoquinas – entre las que destacan el IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  – que, por una parte, inducen un programa antiviral temprano activando la transcripción de varios ISG que bloquean la transcripción y traducción vírica e inducen la degradación del ARN vírico y, por otra, aumentan la citotoxicidad de los linfocitos NK y CD8<sup>+</sup> y promueven la activación y maduración de las células presentadoras de antígeno (APC), ejerciendo un papel fundamental en la promoción de la respuesta adaptativa (232-235). Estudios de RNA-seq han revelado que los principales ISG que se estimulan en la infección por SARS-CoV-2 son mayoritariamente proteínas residentes en el RE y Golgi que regulan un conjunto diverso de funciones celulares, incluyendo la entrada viral, la biosíntesis de nucleótidos y la exocitosis de los viriones (236,237). Entre ellos destacan: i) la proteína transmembrana inducida por interferón 3 (IFITM3) (236,238) y el complejo 6 del antígeno linfocitario, locus E (LY6E) que impiden la entrada viral al interferir con la fusión de membranas mediada por la proteína S (239,240); ii) tres miembros de la familia de proteínas inducidas por interferón con repeticiones de tetratricopéptidos (IFIT)

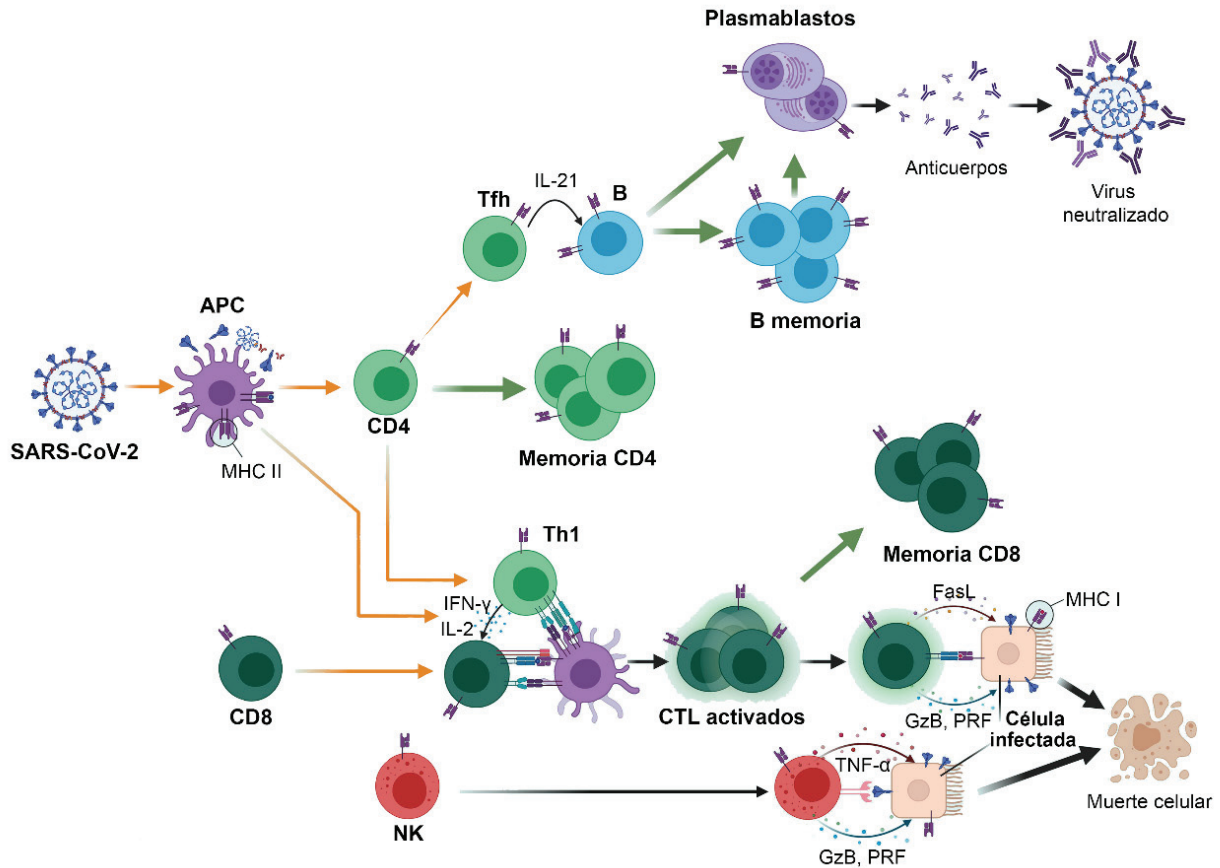
– IFIT1, IFIT3, e IFIT5 – que inhiben la replicación del SARS-CoV-2; y iii) el antígeno estromal de médula ósea 2 (BST2) que bloquea la liberación de los viriones (237).

Además de la producción de IFN tipo I – principalmente por las células dendríticas plasmacitoides –, la activación de fagocitos mononucleares y células epiteliales conduce a la liberación de citoquinas que median la respuesta inflamatoria aguda como la IL-1 $\beta$  o la IL-6 que, a nivel sistémico, inducen la síntesis hepática de reactantes de fase aguda o la fiebre. En el parénquima pulmonar, ambas citoquinas promueven el reclutamiento de neutrófilos y células T citotóxicas. A medida que se logra el control viral local, la IL-6 derivada de los macrófagos promueve la diferenciación de linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh), así como la formación de centros germinales de células B y la producción de anticuerpos para conferir inmunidad a largo plazo (241,242).

#### 4.3.2. Inmunidad Adaptativa en la COVID-19

En la respuesta adaptativa frente a SARS-CoV-2 se originan anticuerpos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos. Los anticuerpos pueden neutralizar el virus bloqueando la unión de la proteína S al receptor ACE2 y pueden promover la función efectora activando el sistema del complemento y uniéndose a los receptores Fc (243). Paralelamente, las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se dirigen frente a una serie de antígenos, incluidas proteínas estructurales y no estructurales, y se asocian significativamente con una enfermedad más leve (244).

Durante la infección vírica, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos se diferencian principalmente en células Th1 – con actividades antivirales a través de la producción de IFN- $\gamma$  y otras citoquinas relacionadas – y células Tfh – que instruyen a los linfocitos B en la producción de anticuerpos específicos y células B de memoria –. Además, una fracción sustancial de los Tfh circulantes específicos frente a SARS-CoV-2 expresan CCR6, un receptor de quimiocinas asociado a la migración a tejidos mucosos, por lo que también desempeñan un papel esencial en la inmunidad de las mucosas (245). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son fundamentales para la eliminación de muchas infecciones víricas, debido a su capacidad para eliminar las células infectadas. En la infección por SARS-CoV-2 muestran altos niveles de moléculas asociadas con potentes funciones efectoras citotóxicas, como IFN- $\gamma$ , granzima B, perforina y CD107a (244,246) (**Figura 6**).

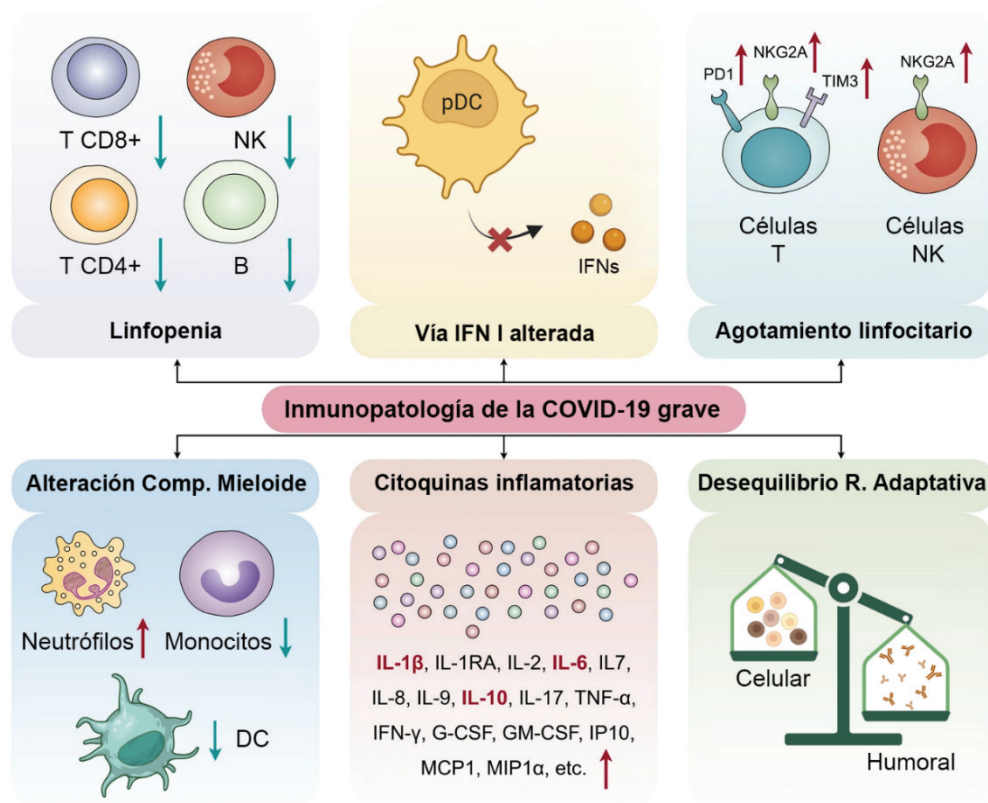


**Figura 6. Respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2.** Los antígenos fagocitados son degradados y presentados a linfocitos T  $CD4^+$  en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) mediante moléculas del MHC-II, induciendo su diferenciación principalmente hacia linfocitos T *helper* 1 (Th1) y linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh). Los Tfh participan en la diferenciación de las células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad y células B de memoria. Los Th1 desempeñan un papel crucial en la formación de la respuesta celular. Contribuyen a la activación de los linfocitos T  $CD8^+$  citotóxicos (CTL) al interactuar simultáneamente con las APC. Los CTL activados median la muerte de las células infectadas por apoptosis mediada por la interacción Fas/FasL y/o mediante la liberación de granzimas (GzB) y perforinas (PRF). De forma similar, cuando las células NK interactúan con células infectadas secretan sus gránulos induciendo la muerte celular.

Adaptada de Primorac D, *et al.* Front Immunol. 2022 (247).

#### 4.4. Alteraciones inmunitarias en COVID-19

Gracias a los esfuerzos de laboratorios de investigación de todo el mundo se ha generado un vasto conocimiento sobre la inmunopatogenicidad del SARS-CoV-2 en tiempo récord. Yang L y colaboradores de la Universidad de Zhengzhou, China, han propuesto seis rasgos distintivos que describen las principales alteraciones inmunológicas que se producen en la fase temprana de la infección por SARS-CoV-2 y predisponen a una enfermedad grave. Estas anomalías son: desregulación en la vía de los IFN tipo I, hiperinflamación, linfopenia, agotamiento linfocitario, desregulación de la respuesta mieloide y heterogeneidad en la inmunidad adaptativa (248) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Principales alteraciones inmunitarias en la infección grave por SARS-CoV-2. Los patrones inmunitarios alterados en la COVID-19 grave incluyen una respuesta de IFN tipo I deteriorada, incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias, linfopenia, alteraciones en el número y función del compartimento mieloide, agotamiento linfocitario y una respuesta adaptativa heterogénea con altos niveles de anticuerpos y una respuesta celular deficiente.

Adaptada de Yang L, *et al.* Signal Transduct Target Ther. 2020 (248) y Mazzone A, *et al.* Semin Immunol. 2021 (249).

En pacientes con COVID-19 grave se ha descrito una respuesta de IFN tipo I alterada, con ausencia de IFN- $\beta$  y baja producción de IFN- $\alpha$  (250,251). Concretamente, defectos en estas vías de señalización como, por ejemplo, errores congénitos en TLR3 e IRF7 (252), la deficiencia recesiva de TLR7 ligada al cromosoma X (253) o la presencia de autoanticuerpos frente a IFN de tipo I (254) se han asociado con la neumonía COVID-19 potencialmente mortal. Esta desregulación de la respuesta de los IFN tipo I, que se produce en las primeras etapas de la infección, afecta al control de la replicación vírica y parece ser el primer paso hacia el empeoramiento de la COVID-19.

La hiperactivación del sistema inmunitario, en parte ocasionada por una replicación viral descontrolada, promueve la producción de altos niveles de citoquinas proinflamatorias (hiperinflamación) (249). Históricamente esta condición se ha denominado síndrome de liberación de citoquinas o tormenta de citoquinas, un síndrome inflamatorio sistémico potencialmente mortal, que implica niveles elevados de citoquinas circulantes e hiperactivación de células inmunitarias, que puede ser desencadenado por tratamientos terapéuticos, patógenos, cánceres, enfermedades autoinmunes o trastornos monogénicos (255,256). Las principales citoquinas que se encuentran elevadas en pacientes con tormenta de citoquinas asociada a COVID-19 incluyen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, proteína-10 inducida por IFN- $\gamma$  (IP-10), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  y -1 $\beta$ , y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (2,257-259). Concretamente, los niveles altos de IL-6 están estrechamente relacionados con una menor supervivencia en la infección por SARS-CoV-2 (260,261) y se han vinculado a una baja expresión de perforina y granzima B, lo que puede conducir a una actividad citotóxica deficiente prolongando la supervivencia de las células infectadas y potenciando, por tanto, la estimulación antigénica y la consiguiente sobreproducción de citoquinas proinflamatorias (262,263). Asimismo, el aumento de IL-1 $\beta$  en las formas graves de la enfermedad se ha relacionado con el síndrome de activación macrofágica y una mielopoyesis de emergencia (264,265).

Las células de la inmunidad innata más involucradas en la patogénesis de la tormenta de citoquinas son los neutrófilos, los macrófagos y las células NK. El ambiente proinflamatorio generado favorece la activación de un mayor número de neutrófilos en circulación – que conduce al aumento de la proporción neutrófilo/linfocito – y en las vías respiratorias de los pacientes con COVID-19 grave (59,258,266). Además, estos

neutrófilos pueden liberar trampas extracelulares (NET) que contribuyen a la formación de trombos y amplifican la producción de citoquinas (267).

De forma similar durante la tormenta de citoquinas, los macrófagos se activan y secretan cantidades excesivas de citoquinas, causando daños tisulares graves que pueden conducir al fallo orgánico (256,268). Concretamente, análisis de secuenciación de célula única (scRNA-seq) de muestras de lavado broncoalveolar han revelado un incremento del compartimento fagocítico mononuclear en los pacientes con COVID-19 grave, caracterizado por una drástica reducción de los macrófagos alveolares residentes en el tejido – que desempeñan una importante función centinela en los pulmones al detectar y desencadenar una potente inmunidad antivírica – y un aumento de monocitos y macrófagos inflamatorios (266,269-271). Los programas inflamatorios observados en estos macrófagos identificaron una fuerte firma genética de interferón coincidente con la descrita en los monocitos de sangre periférica de pacientes graves (272). Además, estos estudios sugieren que el SARS-CoV-2 puede infectar macrófagos alveolares, produciendo una alveolitis de desarrollo lento en la que los macrófagos alveolares – que secretan quimioatrayentes para células T – y las células T – que sintetizan IFN- $\gamma$  que, a su vez, induce la liberación de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos alveolares que promueven aún más la activación de células T –, forman un bucle de retroalimentación positiva que impulsa la inflamación alveolar persistente (271).

Por otro lado, la disminución de la citotoxicidad de las células NK durante la tormenta de citoquinas se ha relacionado con niveles altos de IL-6 (256) y la producción desregulada de TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) (273) lo que puede conducir al fallo del control temprano del virus, una estimulación antigénica prolongada y a dificultades para resolver la inflamación.

Aunque históricamente la linfopenia no suele observarse en los trastornos por tormenta de citoquinas, es un rasgo distintivo de la COVID-19 grave. Estos pacientes muestran una disminución significativa del número absoluto de células T circulantes (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), células B y células NK (258,274). Con frecuencia, el cociente CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> suele ser superior a 1,5, como resultado de una reducción más acusada de células T CD8<sup>+</sup> (249,258). Esta linfopenia se ha asociado al desarrollo de enfermedad grave-crítica y una mayor mortalidad (2,275). Podría deberse al reclutamiento local en el tejido pulmonar o a la adhesión de linfocitos al endotelio (183,276,277). Sin embargo, en

la COVID-19 grave-crítica, también podría ser consecuencia de niveles elevados de IL-6, IL-10 o TNF- $\alpha$  a través de un efecto directo sobre los linfocitos T y por efecto indirecto sobre las DC y los neutrófilos (258,278).

Paralelamente, en la infección grave por SARS-CoV-2 los linfocitos muestran un deterioro funcional en términos de producción de citocinas, actividad citotóxica y una mayor expresión de marcadores de agotamiento como la proteína de muerte programada (PD-1) o la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (TIM3) (279-281).

La progresión de la COVID-19 hacia la fase grave también se caracteriza por alteraciones cuantitativas y cualitativas en el compartimento mielóide. Las DC están significativamente reducidas en los pacientes graves y producen bajos niveles de IFN- $\alpha$  (282,283). Además, las DC plasmocitoides muestran un incremento de las vías proapoptóticas y las relacionadas con TNF- $\alpha$ , IL-6 y NF- $\kappa$ B, lo que podría indicar que la supresión de las respuestas de IFN tipo I conduce a la producción compensatoria de altos niveles de citoquinas proinflamatorias (284,285). Asimismo, exhiben una presentación antigénica deteriorada, que se ha vinculado con la disminución de genes relacionados con el MHC de clase II y su actividad (285,286), así como con los niveles elevados de IL-6 que podrían contribuir a una menor expresión de HLA-DR (265). Por otro lado, tanto los monocitos no clásicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) en circulación como la expresión superficial de HLA-DR se encuentran disminuidos en las formas graves de COVID-19 (284,287). La reducción de estas células en sangre periférica podría relacionarse con la redistribución de los monocitos transicionales y no clásicos y las células dendríticas CD1c<sup>+</sup> en los pulmones de los pacientes graves (288). También se han identificado neutrófilos inmaduros en la sangre y los pulmones de estos pacientes, que se correlaciona con una mielopoyesis de emergencia que genera células mieloides con características inmunosupresoras (289,290). Por otra parte, se ha descrito la aparición de células mieloides supresoras (MDSC) en pacientes con infección grave donde su frecuencia se correlaciona con citoquinas proinflamatorias en suero y la supresión de la respuesta de células T (291,292).

Finalmente, en el último trimestre de 2020 – y de forma previa a la publicación de nuestro primer trabajo – sólo dos estudios habían señalado la relación entre el desarrollo de una respuesta de células T funcional y una COVID-19 leve (244,293). Posteriormente, numerosos artículos han descrito una respuesta adaptativa descoordinada en las formas

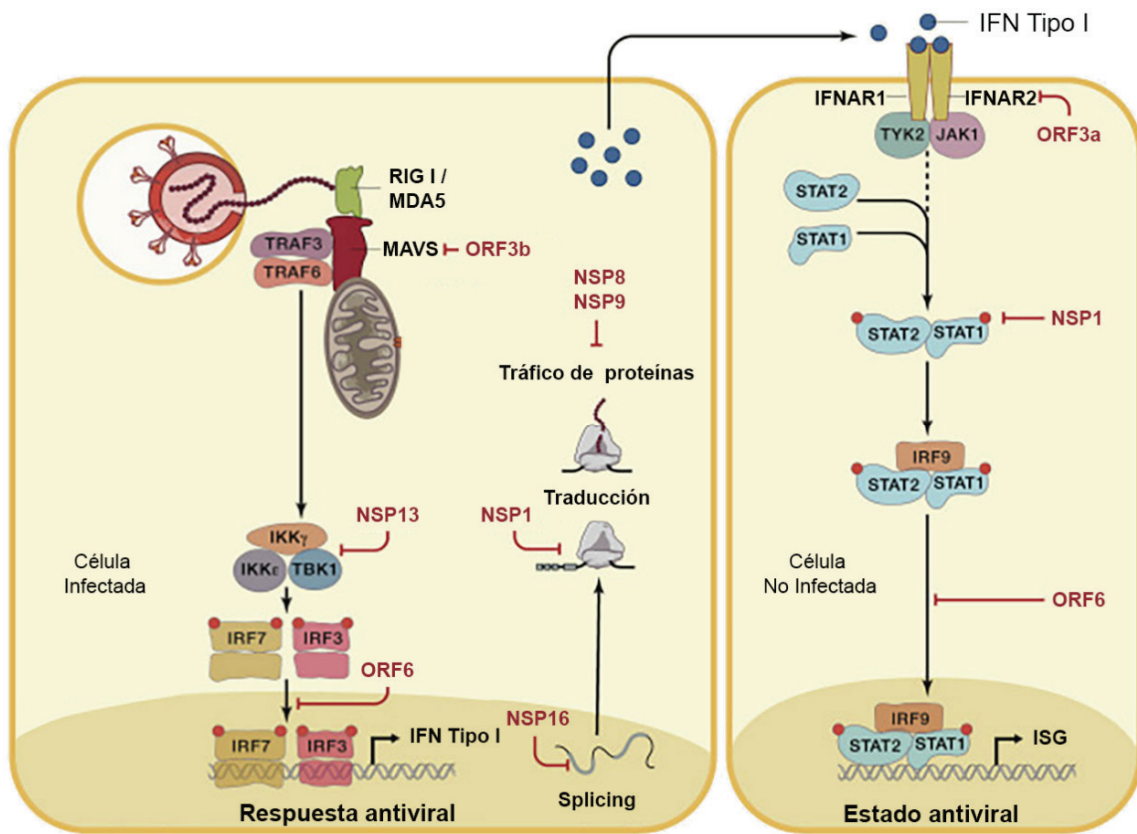
graves de la enfermedad, caracterizadas por una respuesta celular deficiente y una respuesta humoral heterogénea (294,295) probablemente debido, al menos en parte, a la disminución global en la comunicación entre las APC y las células T (285).

#### 4.5. Escape del virus frente a la respuesta inmunitaria

El SARS-CoV-2, al igual que otros virus, puede eludir la respuesta inmunitaria del huésped mediante una variedad de estrategias que abarcan desde la mutación génica hasta la supresión directa de la respuesta inmunitaria.

Los mecanismos intrínsecos por los que el SARS-CoV-2 evade la inmunidad innata incluyen: i) la inhibición de las vías de IFN tipo I, bien mediante el enmascaramiento o la reducción de los PAMP para evadir su detección por los PRR del huésped o bien, mediante la alteración de las vías de señalización; ii) la supresión de la acción directa de IFNs; y iii) la interferencia con la producción global de proteínas del huésped (incluyendo IFNs) (296).

Por ejemplo, para evitar su reconocimiento por los PRR el SARS-CoV-2 exhibe modificaciones en el extremo 5' de su ARN (cap-5') (297). Además, mediante el heterodímero nsp16/nsp10 imita el ARNm celular (298) y cuenta con bajos niveles de motivos CpG, impidiendo la unión de la proteína antiviral con dedos de zinc (ZAP) y la consiguiente degradación del ARN vírico (299). Asimismo, codifica proteínas que alteran directamente la vía de señalización del IFN, como ORF10 que induce la degradación de MAVS mediada por mitofagia (300), nsp14 que reduce la expresión de IFNAR1 (cadena  $\alpha$  del receptor de IFN) (301); nsp15, nsp13 y nsp6 que tienen como diana moléculas implicadas en la translocación nuclear de factores de transcripción proinflamatorios como IRF3, IRF7 o STAT1, (91,302); o los ORF-6 y -9 que suprimen la fosforilación de STAT1 y STAT2 y la translocación nuclear de IRF3 y STAT1 (93,235). Paralelamente, nsp16 suprime el *splicing* global del ARNm y disminuye el reconocimiento del ARN viral por los receptores intracelulares (303). Nsp1 inhibe la síntesis proteica global del huésped secuestrando la maquinaria de traducción para sus propios transcritos (86) (véase apartado 2.3.2.) y nsp8 y nsp9 interfieren en el tráfico de proteínas a la membrana celular (304). Además del impacto en la expresión génica global, estos tres mecanismos contribuyen también a la reducción de la producción de IFN de tipo I (**Figura 8**).



**Figura 8.** Estrategias de evasión inmunitaria del SARS-CoV-2 en la vía de IFN tipo I.

Entre otros, el SARS-CoV-2 es reconocido por PRR que detectan ARN extraño en el citosol, como RIG-I y MDA5. Al unirse al ARN, RIG-I y MDA5 son reclutados en la membrana mitocondrial externa por MAVS. Aguas abajo, la activación de TRAF-3 y -6, TBK1 e IKK, conduce a la fosforilación de los reguladores maestros IRF3 e IRF7, induciendo la expresión de IFN de tipo I. En las células no infectadas, los IFN de tipo I secretados señalizan a través de los receptores de interferón (IFNAR) para activar JAK1 y Tyk2, y posteriormente STAT1, STAT2 e IRF9, que forman un complejo y se trasladan al núcleo para inducir la síntesis de un conjunto de genes estimulados por interferón (ISG) que confieren a la célula un estado antiviral.

En rojo se representan las proteínas del SARS-CoV-2 que contrarrestan la acción antiviral del IFN.

Adaptada de Schultze JL, *et al.* Cell. 2021 (304).

Paralelamente, desde la emergencia del SARS-CoV-2, su genoma ha sufrido constantes y rápidas mutaciones que, sometidas a una fuerte presión evolutiva, propiciaron la aparición de nuevos linajes con una mayor transmisibilidad y escape inmunitario (305). El origen de las primeras VoC tuvo lugar en una población generalmente *naïve*, donde el incremento de la capacidad infecciosa permitía su transmisión a un mayor número de individuos (306). Así, la sucesión de cepas – de Alfa a Delta – cada vez más infecciosas desplazaba rápidamente a la anterior en el dominio poblacional (307). Sin embargo, en la segunda fase de la pandemia, ya con una población altamente inmunizada, un mero incremento de la infecciosidad intrínseca del virus contribuía relativamente poco a la transmisibilidad (306). En consecuencia, la aparición de las siguientes VoC – principalmente Ómicron – se caracterizó por el perfeccionamiento de su capacidad para reinfectar individuos ya inmunizados (308). En este contexto, las mutaciones en la proteína S han tenido especial relevancia ya que pueden afectar a la afinidad del virus por el receptor, la unión a anticuerpos o la estabilidad estructural favoreciendo la evasión inmunitaria (309). Se ha descrito que la sustitución de aminoácidos en el RBD, por ejemplo, el cambio del glutamato en la posición 484 por lisina, glutamina o prolina reduce significativamente la acción de los anticuerpos neutralizantes (310,311). De igual forma, sustituciones que mejoran la afinidad de unión al receptor – como Asn501Tyr (312) – pueden desplazar el equilibrio de unión entre la glicoproteína S y los anticuerpos neutralizantes a favor de una interacción de mayor avidéz entre la glicoproteína y el receptor celular (313). Asimismo, se han descrito varias deleciones en el dominio aminoterminal de S que afectan al reconocimiento por parte de anticuerpos neutralizantes (314,315).

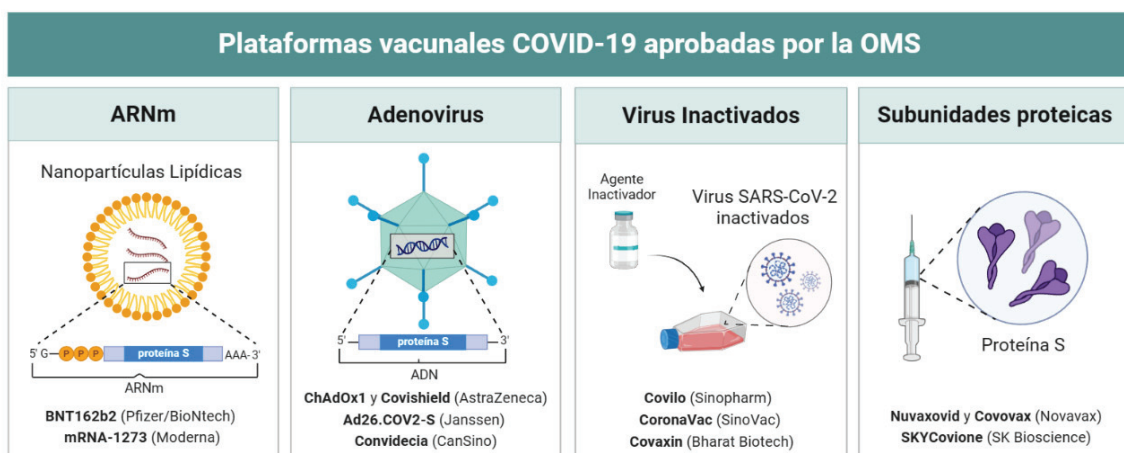
## 5. Vacunación frente a COVID-19

La vacunación contra el SARS-CoV-2 ha demostrado ser la medida más eficaz para controlar la pandemia COVID-19 previniendo la infección y especialmente la enfermedad grave (316,317). Desde que se iniciaron los protocolos de vacunación en diciembre de 2020, se ha estimado que la vacunación mundial contra el SARS-CoV-2 ha salvado casi 20 millones de vidas en su primer año de aplicación (318).

## 5.1. Estrategias vacunales

Los estudios sobre las regiones inmunodominantes del SARS-CoV-2 han sido especialmente importantes para el desarrollo de vacunas. Se ha descrito que los linfocitos T pueden reconocer hasta 10 proteínas diferentes del virus, siendo la proteína S la más inmunodominante, seguida de N, M y otras proteínas no estructurales (319). Además, el RBD se ha establecido como la principal diana de los anticuerpos neutralizantes (320,321). Estos datos han conducido al desarrollo de distintos candidatos vacunales basados en la proteína S.

Hasta la fecha, han sido aprobadas para uso global por la OMS, 12 vacunas COVID-19 que incluyen 4 plataformas de vacunación diferentes: vacunas de ARNm (Comirnaty BNT162b2 de Pfizer/BioNTech y Spikevax mRNA-1273 de Moderna), vacunas basadas en vectores virales no replicativos (Vaxzevria ChAdOx1 y Covishield de Oxford/AstraZeneca, Jcovden Ad26.CO2-S de Janssen (Johnson & Johnson) y Convidecia de CanSino), vacunas de virus inactivados (Covilo de Sinopharm, CoronaVac de Sinovac y Covaxin de Bharat Biotech) y vacunas de subunidades proteicas (Nuvaxovid y Covovax de Novavax y SKYCovione de SK Bioscience) (322) (**Figura 9**). Todas han demostrado altos índices de eficacia en la prevención de la COVID-19, especialmente protegiendo contra la enfermedad grave y la muerte (316,323-327). Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en España se ha autorizado la administración de 4 de estas vacunas: Spikevax, Comirnaty, Vaxzevria y Jcovden (328).



**Figura 9.** Vacunas frente a SARS-CoV-2 autorizadas por la OMS.

Las vacunas de ARNm Comirnaty y Spikevax fueron las primeras en ser autorizadas para uso humano por la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) tan solo 11 meses después de la identificación del SARS-CoV-2 (329). Estas vacunas contienen ARNm sintético que imita la estructura del ARNm endógeno y constan de 5 elementos: i) un cap 5' eucariota que impide el reconocimiento del ARN vírico por los PRR citosólicos y lo protege de la degradación por exonucleasas; ii) regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' flanqueantes que regulan la traducción del ARNm, su vida media y su localización subcelular; iii) un ORF que contiene la secuencia codificante del antígeno que se traduce en proteína; y iv) una cola poli(A) necesaria para la formación de los complejos de traducción (329,330). En ambas vacunas, BNT162b2 y mRNA-1273, el ORF codifica la glicoproteína S completa del SARS-CoV-2 con dos sustituciones de prolina en S2 que bloquean la proteína en su conformación de prefusión (51,331).

Dado que el ARNm es una molécula de gran tamaño ( $10^4$ - $10^6$  Da) cargada negativamente no puede atravesar la bicapa lipídica de las membranas celulares. El mecanismo de liberación intracelular que emplean estas vacunas reside en el uso de nanopartículas lipídicas (LNP) (332). Las LNP ofrecen numerosas ventajas para la administración del ARNm, como su facilidad de formulación, modularidad, biocompatibilidad y gran capacidad de carga útil (329,333). Las LNP incluyen cuatro componentes que encapsulan y protegen el núcleo de ARNm autoensamblándose: i) un lípido ionizable que al cargarse positivamente facilita la encapsulación del ARN; ii) colesterol que mejora la estabilidad rellenando los huecos entre lípidos y ayuda a la fusión con la membrana endosomal; iii) un fosfolípido ayudante que modula la fluidez lipídica y también favorece la fusión con el endosoma; y iv) polietilenglicol (PEG) conjugado con un lípido de anclaje (lípido PEGilado) que regula el tamaño y estabiliza la LNP prolongando su vida media (333,334).

Ambas vacunas se administran por vía intramuscular, idealmente en el músculo deltoides: BNT162b2 en un ciclo de dos dosis de 30  $\mu$ g, con un intervalo recomendado entre ambas de 21 días y mRNA-1273 en dos dosis de 100  $\mu$ g con un intervalo de 28 días (329). Aunque ambas han demostrado ratios de seguridad y eficacia – superior al 95% previniendo la enfermedad grave – excelentes (316,326,327) y su tecnología permite una rápida producción, la necesidad de almacenamiento en cadena de frío plantea dificultades

logísticas. mRNA-1273 puede almacenarse entre 4 y 8 °C durante un mes y 12 horas a temperatura ambiente, mientras que BNT162b2 requiere un almacenamiento a -60 °C (335).

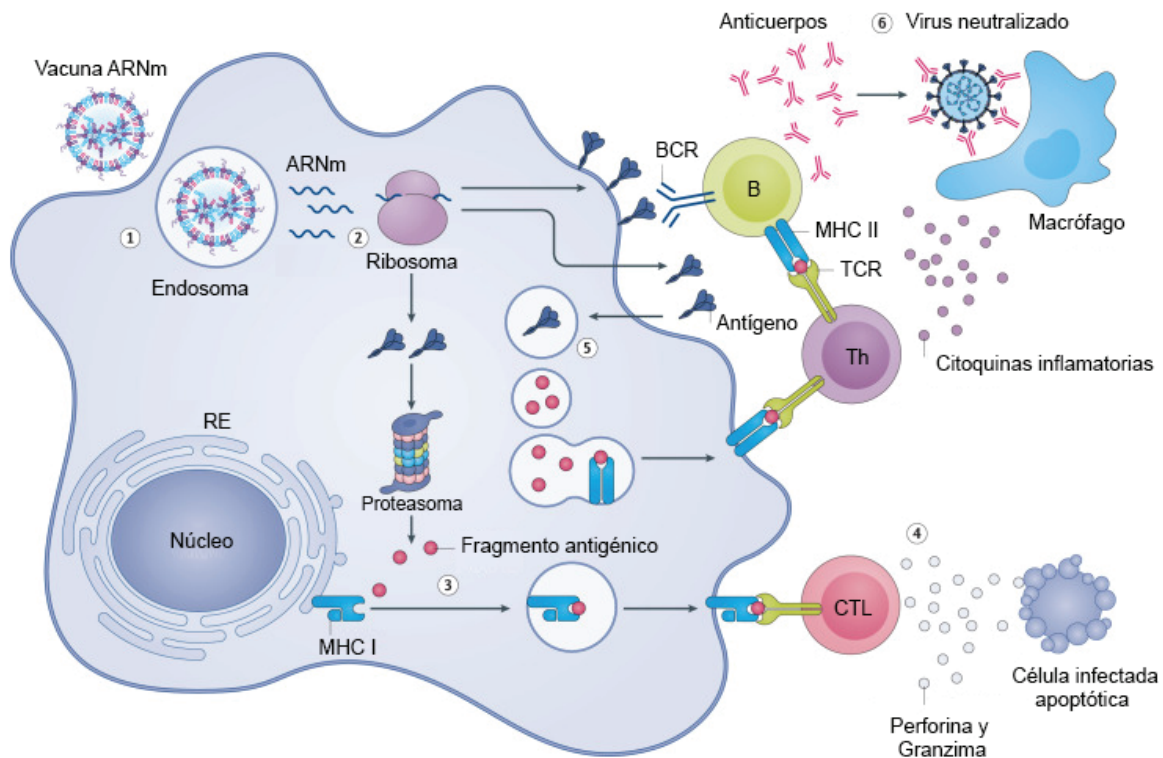
Posteriormente, las vacunas Vaxzevria y Jcovden llegaron a España en febrero y marzo de 2021, respectivamente, con indicación para su aplicación en personas mayores de 50 años, por lo que en nuestra población han sido administradas en menor medida que las vacunas de ARNm (336). Se basan en el empleo de vectores adenovirales que vehiculizan la proteína S para su expresión en la conformación trimérica de prefusión en la superficie de las células infectadas (337,338). Vaxzevria utiliza un vector adenoviral de replicación deficiente basado en el adenovirus de simio tipo Y25 que se ha denominado ChAdOx1 (339). Sigue un esquema de vacunación intramuscular de dos dosis de  $5 \times 10^{10}$  partículas virales, separadas por un intervalo de 28 días, y ha mostrado una eficacia cercana al 70% previniendo la infección sintomática (340,341). Jcovden emplea un vector recombinante de adenovirus humano de tipo 26 (Ad26), incompetente para la replicación, que se administra con un esquema de vacunación característico de una única dosis de  $5 \times 10^{10}$  partículas virales (342) y proporciona una protección en torno al 60% contra la COVID-19 moderada o grave (324,343).

Tanto las vacunas de ARNm como las adenovirales cuentan con un perfil de seguridad elevado (344). Se han asociado generalmente a efectos adversos de leves a moderados, tanto locales – principalmente dolor e hinchazón en la zona de la inyección y linfadenopatía axilar – como sistémicos – fatiga, cefalea, mialgia, artralgia y fiebre – que suelen resolverse en 48 horas y pueden acrecentarse con la administración de la segunda dosis (324-327). La aparición extremadamente infrecuente, en las dos semanas posteriores a la vacunación con plataformas adenovirales, de fenómenos trombóticos en mujeres menores de 50 años generalmente asociados al desarrollo de anticuerpos frente al factor plaquetario 4 que desencadenan depleción plaquetaria y formación de trombos (345,346) ha conducido a la imposición de restricciones basadas en la edad para el uso de estas vacunas (347). Por ejemplo, en España su administración se circunscribe a personas mayores de 60 años (336).

## 5.2. Respuesta inmunitaria a la vacunación frente a SARS-CoV-2

Las dos formulaciones – ARNm que codifica la proteína S encapsulado en LNP o los vectores de adenovirus que codifican la proteína S – son captadas por las DC y otras APC de la zona de la inyección o de los ganglios linfáticos cercanos (329). En el interior celular tiene lugar la producción de proteínas S nativas directamente a partir del ARNm específico en el caso de las vacunas de Pfizer/BioNTech y Moderna, y tras la transcripción y traducción del ADN adenoviral (que permanece extracromosómico) en el caso de las vacunas de Oxford/AstraZeneca y Janssen (348).

Una vez traducida, la proteína antigénica S es capaz de estimular el sistema inmunitario a través de varias vías: i) puede ser degradada en fragmentos más pequeños por el proteasoma y ser presentada en la superficie celular a través del MHC de clase I a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos que, una vez activados, eliminarán las células infectadas mediante la secreción de moléculas citolíticas, como la perforina y la granzima (329,348); y ii) puede secretarse y ser captada por las APC, degradada dentro de los endosomas y presentada en la superficie celular por moléculas del MHC de clase II a los linfocitos Tfh. Paralelamente, la interacción entre las células B cebadas – tras encontrarse con los antígenos vacunales intactos –, las APC y los Tfh específicos promueve la formación del centro germinal donde las células B proliferan, se diferencian y maduran su afinidad para producir anticuerpos de alta afinidad específicos frente al antígeno (348,349). Esta respuesta humoral facilita la eliminación de los patógenos a través de la acción de los anticuerpos neutralizantes y mediante la activación de fagocitos, como los macrófagos, y el sistema del complemento (329) (**Figura 10**).



**Figura 10. Inmunogenicidad de las vacunas de ARNm.** (1) Las vacunas de ARNm son endocitadas por APC. (2) En su citoplasma tiene lugar la síntesis de proteínas S nativas a partir de la información codificada en el ARNm. La proteína S traducida puede estimular el sistema inmunitario de varias maneras: (3) En el proteasoma, el antígeno es procesado en fragmentos más pequeños que son expuestos por moléculas de clase I del MHC en la superficie celular a las células T citotóxicas. (4) Las células T citotóxicas (CTL) activadas eliminan las células infectadas mediante la secreción de moléculas citolíticas, como la perforina y la granzima. (5) Además, los antígenos secretados pueden ser captados por las células, degradados dentro de los endosomas y presentados en la superficie celular a los linfocitos T cooperadores (Th) mediante proteínas de clase II del MHC. (6) Los linfocitos T cooperadores facilitan la eliminación de los patógenos circulantes estimulando la producción de anticuerpos específicos por parte de los linfocitos B y activando fagocitos, como los macrófagos, mediante citoquinas inflamatorias.

BCR: Receptor de células B; MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad; TCR: Receptor de células T; RE: Retículo Endoplasmático.

Adaptada de Chaudhary N, *et al.* Nat Rev Drug Discov. 2021 (329).

De forma previa a la publicación de nuestro primer trabajo sobre la vacunación de ARNm, únicamente existían estudios sobre la inmunogenicidad de BNT162b2 en población general que se expandían hasta 1 (350-352) y 3 meses tras de la vacunación (353) y sobre el mantenimiento de las respuestas humorales inducidas por la vacuna hasta 6 meses después (354,355). Sin embargo, la información sobre la dinámica y la duración a largo plazo de la respuesta celular a la vacunación, es decir, la mediada por linfocitos T específicos, era inexistente.

Posteriormente se ha generado un vasto y detallado conocimiento sobre la inmunogenicidad de estas plataformas vacunales en el mundo real. Concretamente, se ha descrito que las vacunas de ARNm frente a SARS-CoV-2 generan potentes reacciones del centro germinal e inducen la diferenciación de células Tfh específicas (356,357), así como una potente y temprana respuesta de anticuerpos que disminuye bruscamente a partir de los 3 meses tras la vacunación (352,358-360), donde los anticuerpos neutralizantes desarrollados muestran una semivida de aproximadamente 60 días (361,362). En cambio, se ha informado de que la vacuna Ad26.COV2-S de Janssen induce niveles iniciales más bajos de anticuerpos neutralizantes, pero éstos permanecen estables hasta 8 meses después de la vacunación (363,364).

También se ha demostrado que la vacunación COVID-19 induce una respuesta robusta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (365-367). Como era de esperar, las vacunas basadas en ARNm y vectores de adenovirus inducen únicamente linfocitos T específicos frente a S que, al igual que en la infección natural, muestran un perfil Th1 predominante (368-370). Asimismo, la inducción temprana de CD8<sup>+</sup> específicos podría explicar la rápida protección mediada por la vacuna contra la enfermedad grave que se ha descrito a los 10 días tras la administración (371), cuando los anticuerpos neutralizantes son apenas detectables (370,372). Del mismo modo, los estudios en primates no humanos destacan el potencial de las respuestas CD8<sup>+</sup> inducidas por la vacunación para contribuir a la reducción de la carga viral y a la contención de la enfermedad (373).

### **5.3. Inmunidad híbrida**

El término inmunidad híbrida se aplica a aquellos individuos con infección previa por SARS-CoV-2 que posteriormente fueron vacunados o viceversa, mostrando así una combinación de inmunidad inducida por la infección y por la vacunación (374). Se ha

observado que sujetos con infección previa por SARS-CoV-2 desarrollan respuestas inusualmente fuertes a las vacunas COVID-19 (375,376). Concretamente, muestran títulos de anticuerpos neutralizantes sustancialmente más elevados (352,377) y un aumento general de la respuesta de linfocitos T (378,379) incluso con una única dosis (380). Del mismo modo, la inmunidad híbrida resultante de la infección por SARS-CoV-2 de un sujeto previamente vacunado (*breakthrough infection* o infección de brecha) también da lugar a respuestas inmunitarias adaptativas igualmente robustas (381,382). Además, la vacunación con BNT162b2 reduce la carga viral de las infecciones que se producen tras la primera dosis, contribuyendo a una menor infecciosidad y un mejor control sobre la propagación del virus (383).



# **JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## JUSTIFICACIÓN

---

La pandemia originada por el SARS-CoV-2 ha provocado más de 7 millones de muertes en todo el mundo y 775 millones de casos de COVID-19, cuyo espectro clínico oscila entre infecciones asintomáticas o manifestaciones leves de tipo gripal, hasta neumonías potencialmente mortales. Rápidamente y, gracias al conocimiento generado de forma masiva por equipos de todo el mundo, esta diversidad en la gravedad de la infección se asoció a características demográficas, como la edad y el sexo masculino, y a la presencia de comorbilidades, principalmente obesidad, diabetes o hipertensión.

De igual forma, se señaló tempranamente el papel de la respuesta inmunitaria en la evolución de la enfermedad, sugiriendo que para controlar y eliminar eficazmente la infección por SARS-CoV-2 sería necesaria una respuesta coordinada entre la inmunidad innata y la adaptativa. Con respecto a la primera, en pacientes graves y críticos se observó un predominio inflamatorio con hiperactivación de macrófagos y tormenta de citoquinas, así como una respuesta de IFN tipo I deteriorada, relacionada con la presencia de autoanticuerpos y variantes de pérdida de función en los loci que controlan TLR3 e IRF7.

Con respecto a la inmunidad adaptativa, en 2020 y 2021, cuando el número de trabajos que interrogaban la respuesta humoral y celular en los individuos infectados era muy limitado y, en ocasiones, generaba información contradictoria, nuestro grupo se planteó evaluar cómo se desarrollaba la respuesta adaptativa durante la infección aguda por SARS-CoV-2 y su relación con las formas clínicas de distinta gravedad de la COVID-19. Existía entonces la necesidad de comprender si la inducción temprana de células T específicas, de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, o ambos, eran necesarios o suficientes para limitar la gravedad de la enfermedad, y cómo de importante era que los dos brazos de la inmunidad adaptativa, celular y humoral, se desarrollaran con una cinética equilibrada y coordinada para contener la severidad y mortalidad por COVID-19.

Posteriormente, tras la implementación del programa de vacunación al personal sanitario del Hospital Universitario 12 de Octubre a finales de 2020, y ante el desconocimiento de la respuesta inmunitaria a las nuevas formulaciones vacunales basadas en ARNm encapsulado, así como el escaso número de estudios en población general sobre el efecto de las vacunas COVID-19, nos propusimos analizar el desarrollo

y mantenimiento de la respuesta adaptativa tras la vacunación en población inmunocompetente.

Aunque el panorama de la COVID-19 ha evolucionado sustancialmente desde el inicio de la pandemia – parece probable que la presencia de SARS-CoV-2 en humanos se estabilice causando infecciones de tipo estacional como la mayoría de los virus respiratorios –, sigue siendo de gran relevancia comprender cómo se desarrollan las respuestas inmunitarias tras la infección y la vacunación y cómo se traducen en protección contra la infección y las formas graves de la enfermedad, así como la búsqueda de potenciales mejoras en las estrategias de vacunación.

## **HIPÓTESIS**

---

Por un lado, en este trabajo se hipotetizó que existiría una relación entre el correcto desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa y la gravedad de la infección por SARS-CoV-2, de forma que los sujetos con una respuesta temprana, equilibrada y coordinada serían capaces de controlar y resolver la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, los individuos con una respuesta tardía o defectuosa fracasarían a la hora de controlar la replicación viral, lo que conduciría a formas graves de la enfermedad.

Por otro lado, una mejor comprensión de la duración de las respuestas inmunitarias específicas frente a SARS-CoV-2 tras la infección y/o la vacunación, así como la evaluación del efecto de las dosis de refuerzo sobre dichas respuestas, permitiría tomar decisiones informadas sobre la adecuación, y el intervalo óptimo, de las dosis vacunales sucesivas, así como el establecimiento de correlatos de protección.

## **OBJETIVOS**

---

El objetivo general de este trabajo ha sido comprender cómo se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa frente a SARS-CoV-2 durante la infección natural – su relación con las formas clínicas de distinta gravedad de la COVID-19 y su mantenimiento a largo plazo – y durante la vacunación de ARNm – analizando su cinética a largo plazo, su relación con la protección frente a infecciones posteriores y el efecto de las dosis de refuerzo en la inmunidad preexistente –.

# CAPÍTULOS

---



# CAPÍTULO 1

---

## *Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination*

Patricia Almendro-Vázquez, Rocío Laguna-Goya, María Ruiz-Ruigomez, Alberto Utrero-Rico, Antonio Lalueza, Guillermo Maestro de la Calle, Pilar Delgado, Luis Pérez-Ordoño, Eva Muro, Juan Vila, Isabel Zamarrón, Miguel Moreno-Batanero, Marta Chivite-Lacaba, Francisco Javier Gil-Etayo, Carmen Martín-Higuera, María Ángeles Meléndez-Carmona, Carlos Lumbreras, Irene Arellano, Balbino Alarcón, Luis Miguel Allende, José María Aguado, Estela Paz-Artal.

*PLoS Pathog.* 2021 Dec 28;17(12):e1010211. doi: 10.1371/journal.ppat.1010211.



## INTRODUCCIÓN

---

A mediados de 2020 la disparidad clínica de la COVID-19 entre distintos pacientes se asociaba a factores como la edad, el sexo masculino, la presencia de comorbilidades o una respuesta inmunitaria innata alterada. Sin embargo, el papel de la respuesta inmunitaria adaptativa en la protección frente a la infección era prácticamente desconocido. Concretamente, el desarrollo de la respuesta inmunitaria celular específica durante la fase aguda de la infección aún no se había caracterizado a excepción de dos estudios, con un número limitado de pacientes, donde se indicaba que la inducción precoz de células T específicas frente al virus podía contener la gravedad de la COVID-19.

Asimismo, era muy limitada la información disponible sobre el mantenimiento, a largo plazo y en el mundo real, de la respuesta adaptativa inducida por la nueva formulación vacunal basada en ARN mensajero BNT162b2 de Pfizer/BioNTech. Se habían realizado estudios sobre la inmunogenicidad T y B hasta un mes después de la vacunación y seguimientos de la respuesta humoral hasta seis meses tras la vacunación. Sin embargo, no existían datos sobre la dinámica y la duración a largo plazo de la respuesta T en población general.

## OBJETIVOS

---

Con estos antecedentes, nos propusimos analizar longitudinalmente el desarrollo de las respuestas protectoras óptimas tras la infección y la vacunación frente a SARS-CoV-2, reclutando un total de 380 sujetos que fueron englobados en diferentes cohortes. Los objetivos planteados fueron:

1. Caracterizar de forma longitudinal el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa durante la infección aguda por SARS-CoV-2.
2. Evaluar la dinámica de las respuestas humoral y celular y su posible relación con la gravedad clínica de la COVID-19.
3. Caracterizar y cuantificar el mantenimiento de la respuesta inmunitaria adaptativa tras la COVID-19 moderada o grave.
4. Estudiar el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad adaptativa tras la vacunación con BNT162b2.

## CONCLUSIONES

---

1. La dinámica de la inmunidad adaptativa se asocia con la gravedad de la COVID-19. La inducción de una respuesta celular temprana frente a SARS-CoV-2 es esencial para el control de la enfermedad y el retraso en el desarrollo de esta respuesta de células T específicas se asocia con un curso grave de la infección.
2. La presencia de células T específicas frente a SARS-CoV-2 a la llegada a urgencias es un factor pronóstico y protector contra el desarrollo de COVID-19 grave, independientemente de la edad y el sexo.
3. Casi la totalidad de los sujetos mantienen respuesta celular (97%) y humoral (99%) específica frente a SARS-CoV-2 seis meses tras la infección. De 4 a 7 meses post-infección la respuesta celular se mantiene estable mientras que los niveles de anticuerpos disminuyen progresiva y significativamente.
4. Tras la infección, los sujetos recuperados de COVID-19 moderado o grave muestran un estado de hiperactivación general de la respuesta celular.
5. Una única dosis de BNT162b2 induce el desarrollo de células T y anticuerpos específicos frente a la espícula del SARS-CoV-2 en el 82% y el 94% de los sujetos *naïve*, respectivamente. El 100% exhibe una respuesta adaptativa robusta y competente tras la segunda dosis.
6. Son necesarias dos dosis de BNT162b2 para el desarrollo de anticuerpos con capacidad neutralizante.
7. La respuesta T a la vacuna BNT162b2 está dirigida exclusivamente por células Th1 activadas.
8. El pico de la respuesta adaptativa a la vacuna BNT162b2 ocurre a las 2 semanas tras la administración de la segunda dosis. La magnitud de la respuesta de células T específicas es similar a la desarrollada durante la infección natural aguda. Los niveles de anticuerpos inducidos tras la vacunación son significativamente superiores a los generados de forma natural en la infección, aunque su capacidad neutralizante es significativamente más reducida.

9. A los 3 meses tras la vacunación, el 97% y el 100% de los sujetos muestran células T y anticuerpos específicos frente al virus, respectivamente. Se observa una disminución progresiva y significativa de la respuesta adaptativa global a los meses 1 y 3 tras la vacunación.



# CAPÍTULO 1

---

**PUBLICACIÓN**

---



RESEARCH ARTICLE

# Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination

Patricia Almendro-Vázquez<sup>1</sup>, Rocio Laguna-Goya<sup>1,2,3\*</sup>, Maria Ruiz-Ruigomez<sup>1,4</sup>, Alberto Utrero-Rico<sup>1</sup>, Antonio Lalueza<sup>1,3,4,5</sup>, Guillermo Maestro de la Calle<sup>1,4</sup>, Pilar Delgado<sup>6</sup>, Luis Perez-Ordoño<sup>7</sup>, Eva Muro<sup>7</sup>, Juan Vila<sup>7</sup>, Isabel Zamarron<sup>7</sup>, Miguel Moreno-Batanero<sup>1</sup>, Marta Chivite-Lacaba<sup>1</sup>, Francisco Javier Gil-Etayo<sup>1,2</sup>, Carmen Martín-Higuera<sup>1,8</sup>, María Ángeles Meléndez-Carmona<sup>1,8</sup>, Carlos Lumberas<sup>1,3,4,5</sup>, Irene Arellano<sup>6</sup>, Balbino Alarcon<sup>6</sup>, Luis Miguel Allende<sup>1,2,9</sup>, Jose Maria Aguado<sup>1,4,10</sup>, Estela Paz-Artal<sup>1,2,3,9</sup>

**1** Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain, **2** Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **3** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **4** Department of Internal Medicine, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **5** Department of Medicine, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **6** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **7** Department of Emergency Medicine, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **8** Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **9** Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **10** Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

\* [rocio.laguna@salud.madrid.org](mailto:rocio.laguna@salud.madrid.org)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Almendro-Vázquez P, Laguna-Goya R, Ruiz-Ruigomez M, Utrero-Rico A, Lalueza A, Maestro de la Calle G, et al. (2021) Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination. *PLoS Pathog* 17(12): e1010211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211>

**Editor:** Suján Shresta, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, UNITED STATES

**Received:** August 26, 2021

**Accepted:** December 16, 2021

**Published:** December 28, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211>

**Copyright:** © 2021 Almendro-Vázquez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Abstract

The timing of the development of specific adaptive immunity after natural SARS-CoV-2 infection, and its relevance in clinical outcome, has not been characterized in depth. Description of the long-term maintenance of both cellular and humoral responses elicited by real-world anti-SARS-CoV-2 vaccination is still scarce. Here we aimed to understand the development of optimal protective responses after SARS-CoV-2 infection and vaccination. We performed an early, longitudinal study of S1-, M- and N-specific IFN-γ and IL-2 T cell immunity and anti-S total and neutralizing antibodies in 88 mild, moderate or severe acute COVID-19 patients. Moreover, SARS-CoV-2-specific adaptive immunity was also analysed in 234 COVID-19 recovered subjects, 28 uninfected BNT162b2-vaccinees and 30 uninfected healthy controls. Upon natural infection, cellular and humoral responses were early and coordinated in mild patients, while weak and inconsistent in severe patients. The S1-specific cellular response measured at hospital arrival was an independent predictive factor against severity. In COVID-19 recovered patients, four to seven months post-infection, cellular immunity was maintained but antibodies and neutralization capacity declined. Finally, a robust Th1-driven immune response was developed in uninfected BNT162b2-vaccinees. Three months post-vaccination, the cellular response was comparable, while the humoral response was consistently stronger, to that measured in COVID-19 recovered patients. Thus, measurement of both humoral and cellular responses provides information on

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation (COVID-19 research call COV20/00181) — co-financed by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative Program Intelligent Growth 2014-2020, by Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid (CIVICO study 2020/0082) and by a private donation (code 2021/55). RLG holds a research contract “Rio Hortega” (CM19/00120) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation. MCL holds a predoctoral fellowship (FPU19/06393) from the Spanish Ministry of Science and Innovation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

prognosis and protection from infection, which may add value for individual and public health recommendations.

## Author summary

In this work we describe the prognostic value of early detection of SARS-CoV-2-specific T cell response in acute COVID-19, as patients without a prompt SARS-CoV-2-specific T cell response progress to severe COVID-19. We also show that the presence of specific T cells against SARS-CoV-2 when patients arrive to the emergency room is a protective factor against developing severe COVID-19, independently of the age and gender of the patient, which are two major known contributors to disease outcome. In addition, we show robust cellular and humoral immune responses persist 3 months after real-world vaccination.

## Introduction

SARS-CoV-2 infection is responsible for the current coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Most SARS-CoV-2-infected subjects show mild or no symptoms, however, an important proportion of patients require hospitalization and some of them die [1]. This disparity in disease severity has been associated with characteristics such as age, male sex and comorbidities [1–3]. The immune response elicited by SARS-CoV-2 in each individual could also be related to the clinical outcome of the infection. An exaggerated innate immune activation has been extensively described in patients with a severe course of the disease [4–8], while the role of adaptive immune response in protection from this infection is less understood.

SARS-CoV-2-specific T cells have been detected during convalescence and up to eight months post-symptom onset (PSO) in COVID-19 patients [9–14]. However, the development of the specific cellular immune response during the acute phase of infection has not yet been characterized in-depth, except for several studies, with a limited number of patients, indicating that early induction of SARS-CoV-2-specific T cells can limit COVID-19 severity [15–17]. Humoral responses to SARS-CoV-2 have been described from acute infection to convalescence and up to 8 months post-infection. Levels of specific antibodies have been positively correlated with disease severity [11,18,19] and a delayed production of neutralizing antibodies has been associated with fatal COVID-19 [20]. The correct kinetics and balance between the two arms of the adaptive immune response may be crucial for the resolution of the infection.

The mRNA vaccine BNT162b2 was approved after showing safety and a 95% efficacy in preventing COVID-19 [21]. A two-dose regimen, 21 days apart, was established with the previous vaccine candidate BNT162b1 in order to develop neutralizing antibodies [22]. BNT162b2 has proven its effectiveness in reducing symptomatic SARS-CoV-2 infection [23,24]. There are studies on the immunogenicity of BNT162b2 which expand up to a month post-vaccination [25–27] and on the maintenance of vaccine-induced humoral responses six months post-vaccination [28,29], however, data on the dynamics and long-term duration of SARS-CoV-2 specific T cells after real-world vaccination are still lacking.

Here we longitudinally characterize the adaptive immune responses during acute and convalescent COVID-19 phases in three well-defined patient cohorts of different severity, in recovered patients up to 7 months PSO and in uninfected subjects up to three months after full vaccination. Our acute infection cohort represents the largest of its kind, with 88 patients

recruited before any medication was administered (in particular no immunomodulatory drugs) and has allowed us to statistically demonstrate that the presence of specific T cells against SARS-CoV-2 when patients arrive to the emergency room is a protective factor against developing severe COVID-19, independently of the age and gender of the patient. We also describe a correlation between higher numbers of specific T cells and lower viral load at diagnosis, which could explain the protection conferred by T cells. In addition, we characterize the vaccine-elicited adaptive immunity at five time-points and show robust cellular and humoral immune responses persist 3 months after real-world vaccination.

## Results

### Study design and participants

Cellular and humoral SARS-CoV-2-specific immune responses were analyzed in patients with natural infection, uninfected healthy controls and BNT162b2 vaccinated individuals. Samples were obtained upon arrival to the emergency room (ER), prior to any treatment administration, in patients with acute COVID-19 who were later classified according to their maximum disease severity into mild ( $N = 32$ ), moderate ( $N = 34$ ) and severe ( $N = 22$ ) (see classification criteria in Fig 1A). Mild patients were not hospitalized, and moderate and severe patients required hospitalization. Clinical and demographic characteristics, WHO ordinal scale [30] and treatments are detailed in Table 1. Patients attended the ER a week PSO on average in the 3 groups. In moderate and severe patients, a follow-up sample was taken a week after hospitalization. In mild and moderate patients another sample was taken during the convalescent phase, a month PSO.

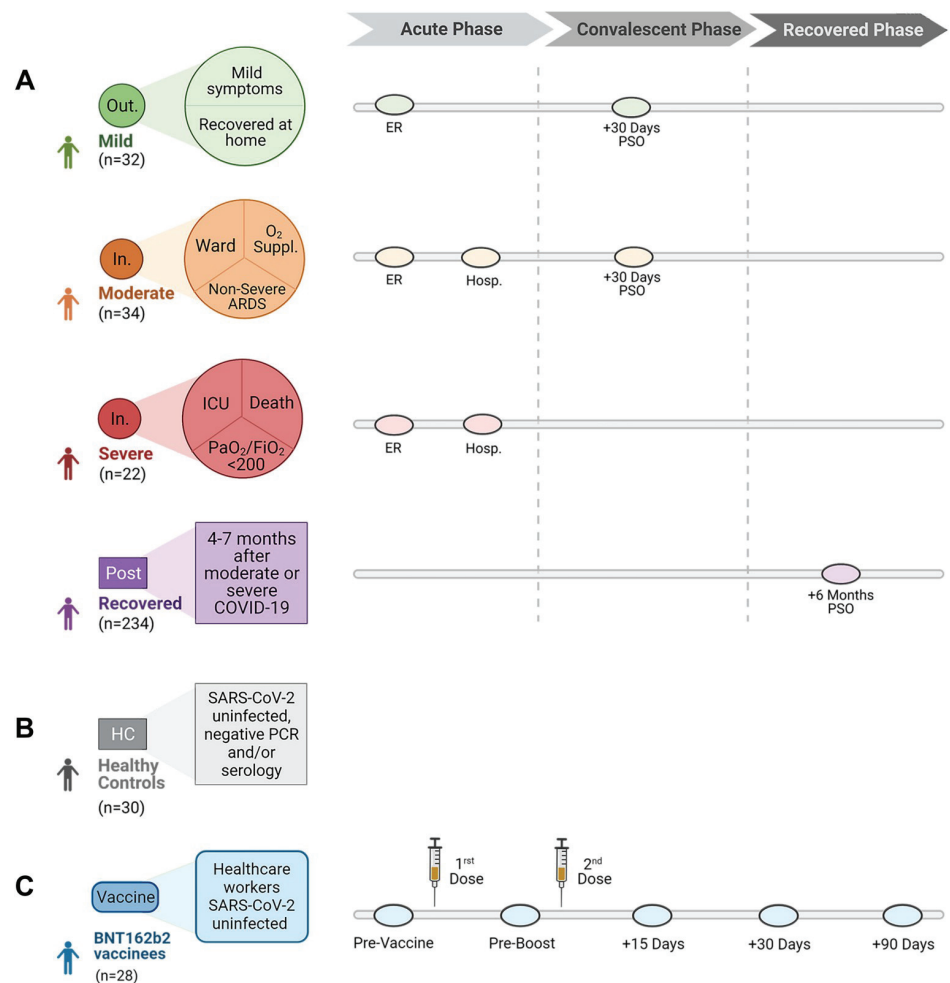
Samples from 234 COVID-19 recovered patients were obtained, between 4 and 7 months PSO. All recovered patients had been hospitalized during the acute phase with moderate or severe COVID-19 (WHO ordinal scale of 3–7). The use of corticosteroids in the recovered cohort was lower than in the acute infection cohort, consistent with a change in treatment guidelines from the first to the second pandemic wave (Table 1).

A 30 healthy control cohort included subjects with SARS-CoV-2 negative serology and no prior known contact with SARS-CoV-2 positive cases (Fig 1B). The operating characteristics (ROC) curve analysis with recovered patients and healthy controls allowed to determine the cut-off values of 25, 21 and 14 IFN- $\gamma$  spots forming units (sfu)/ $10^6$  PBMC as positive cellular responses against the domain S1 of spike (S1), membrane (M) and nucleocapsid (N) proteins respectively, with high sensitivity and specificity (S1 Fig).

Lastly, vaccinated individuals were 28 healthcare workers, without previous SARS-CoV-2 infection (Fig 1C). They received two 30  $\mu$ g doses of BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), 21 days apart. Samples were obtained pre-vaccine, pre-boost and 15, 30 and 90 days after completing vaccination. 22/28 (79%) vaccinees were females, and the median age was 40 (interquartile range [IQR] 26–57 years).

### Development of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity during acute infection

SARS-CoV-2-specific T cells, IgG and neutralizing antibodies were sequentially analyzed in patients with natural infection, at their arrival to ER and during convalescence. Mild patients had a detectable, potent cellular immune response against S1, M and N, already within the first 2 weeks PSO (Figs 2A and S2). During this time period, a gradual increase in the specific cellular responses and positive correlations between the cellular response against the 3 proteins and days PSO (DPSO) were observed ( $p < 0.001$ , Fig 2B). The peak of the SARS-CoV-2-specific



**Fig 1. Overview of patient cohorts including the time of sample collection.** (A) Patients with natural infection classified according to their maximum disease severity. As depicted, samples were obtained upon arrival to the emergency room (ER), a week after hospitalization (Hosp.), and during the convalescent and recovered phases depending on each cohort. (B) Healthy controls SARS-CoV-2 uninfected with negative PCR and/or serology. (C) Vaccinated individuals who received two doses of BNT162b2 21 days apart. Samples were collected pre-vaccine, pre-boost and 15, 30 and 90 days after receiving the second vaccine dose. Out.: out-patients; In.: in-patients; ICU: Intensive care unit; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>: Partial pressure of arterial oxygen/Fraction of inspired oxygen ratio; PSO: Post-symptom onset. [Fig 1](#) created with BioRender.com.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g001>

cellular response occurred 2 weeks PSO in mild patients, and although the responses to S1, M and N were generally parallel and correlated positively ([Fig 2B](#)), the peak cellular response was more potent against S1 and N than M (median of 1052, 838 and 637 peak IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC, respectively). The cellular immune response developed upon natural SARS-CoV-2 infection gave rise to detectable IFN- $\gamma$ -, interleukin (IL)-2- and bifunctional IFN- $\gamma$ /IL-2-producing T cells ([S3 Fig](#)). IFN- $\gamma$  and IL-2 responses were similar in magnitude and correlated repeatedly in all patient cohorts ([Fig 2B](#)). For that reason, and for the sake of brevity, we will focus on data on IFN- $\gamma$  mostly. Apart from the sfu, which correspond with the frequency of antigen-specific T cell clones, we obtained the relative spot volume (RSV) which represented the amount of secreted analyte (either IFN- $\gamma$  or IL-2). The total amount of secreted analyte correlated repeatedly with the frequency of specific T cells ([Fig 2B](#)). After the peak of the

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the cohorts.**

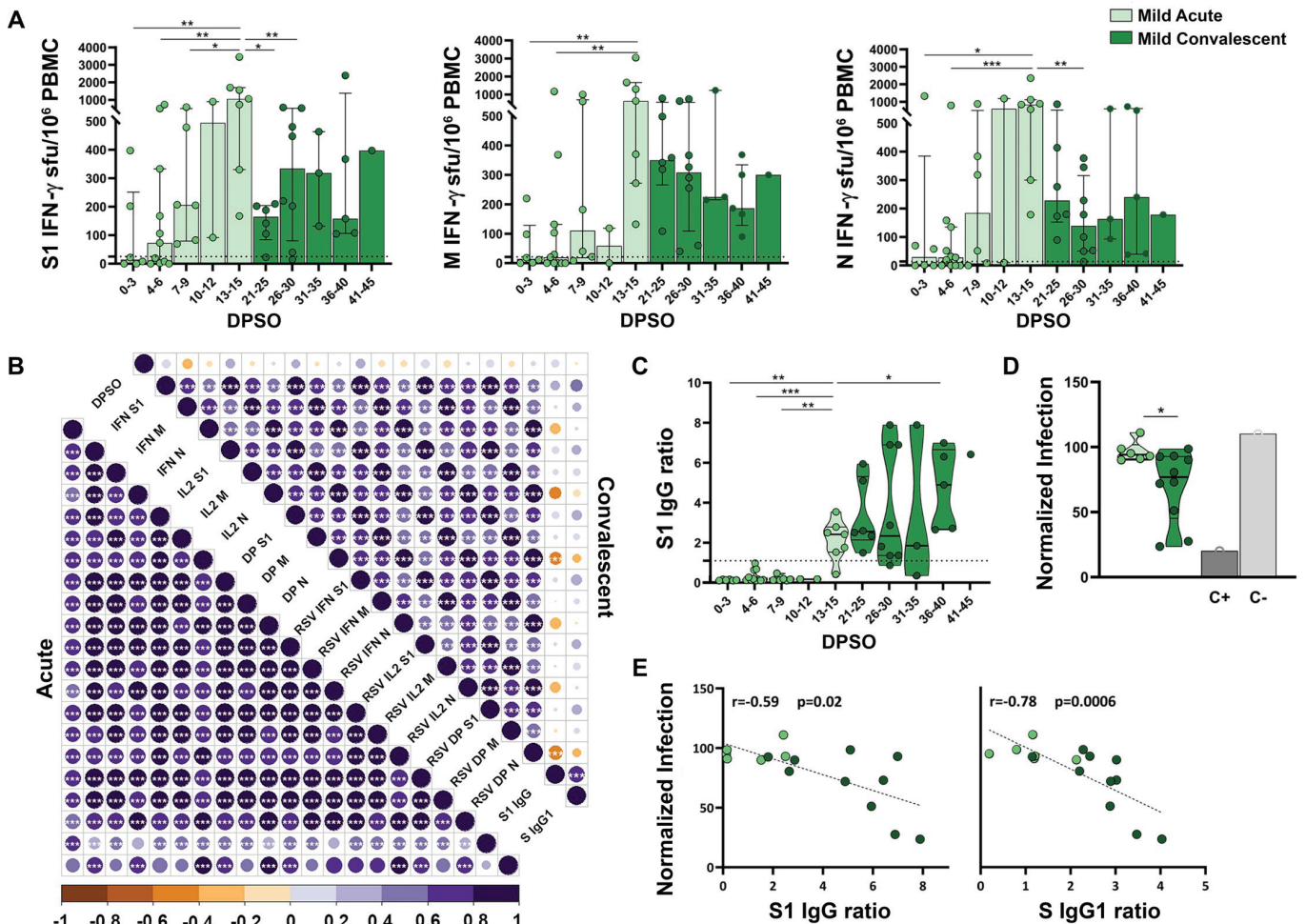
	Mild (N = 32)	Moderate (N = 34)	Severe (N = 22)	Recovered (N = 234)
Age (years), median (IQR)	39 (30–51)	55 (50–67)	64 (52–76)	58 (48–71)
Female (%)	22 (69%)	12 (35%)	3 (14%)	112 (48%)
Maximum disease severity (WHO score)	2	3–4	5–8	3–7
Days from symptom onset (at emergency room or recovered sample), median (IQR)	6 (4–10)	8 (5–9)	7 (4–11)	170 (157–186)
Length of hospital stay (days), median (IQR)		5 (3–7)	12 (8–19)	9 (7–14)
COVID-19 treatment during hospitalization (%)				
Corticosteroids		22 (65%)	21 (95%)	87 (37%)
Tocilizumab		2 (6%)	8 (36%)	47 (20%)
Remdesivir		2 (6%)	11 (50%)	4 (2%)
Oxygen		16 (47%)	22 (100%)	152 (65%)
Death (%)			8 (36%)	
Sample collection date	Nov-Dec 2020	Nov-Dec 2020	Sept-Dec 2020	August-Sept 2020

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.t001>

cellular response, SARS-CoV-2-specific T cells decreased but were still detectable during convalescence, between 21 and 45 DPSO, with similar magnitude in the responses against S1, M and N (median of 202, 300 and 178 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC, respectively, Fig 2A). Most mild patients did not have detectable SARS-CoV-2-specific IgG upon arrival to ER. IgG detection started on day 13 PSO and increased during convalescence ( $p < 0.05$ , Fig 2C). Anti-S1 IgG antibodies measured by ELISA correlated with anti-Spike IgG1 measured by a newly developed high-sensitivity flow cytometry method [31], especially during convalescence when the humoral response was fully developed ( $p < 0.001$ , Fig 2B). In addition to quantifying SARS-CoV-2-binding antibodies, we measured their functionality in a classical pseudovirus neutralization assay. Antibodies from mild disease patients showed a modest neutralizing capacity (Fig 2D). Both anti-S1 IgG and anti-Spike IgG1 positively correlated with the neutralizing capacity of serum samples ( $r = -0.59$ ,  $p < 0.05$  and  $r = -0.78$ ,  $p < 0.001$ , correlation with normalized infection, Fig 2E).

Moderate patients had a detectable cellular immune response against S1, M and N, within the first 2 weeks PSO (Figs 3A and S2), which did not correlate with DPSO (Fig 3B). The peak of cellular immunity occurred at 21–24 DPSO, with a median of 838, 767 and 483 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC for S1, M and N responses respectively (Fig 3A). During convalescence (21 to 40 DPSO), S1, M and N-specific T cells remained detectable (median of 378, 370 and 107 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC, respectively, Fig 3A). Most moderate patients did not have detectable SARS-CoV-2-specific IgG upon arrival to ER (Fig 3C), however, they developed high antibody levels with a robust neutralizing capacity during convalescence (Fig 3D). There were strong correlations between antibody amounts and neutralization ( $r = -0.79$ ,  $p < 0.001$  for anti-S1 IgG, and  $r = -0.87$ ,  $p < 0.0001$  for anti-Spike IgG1, Fig 3E).

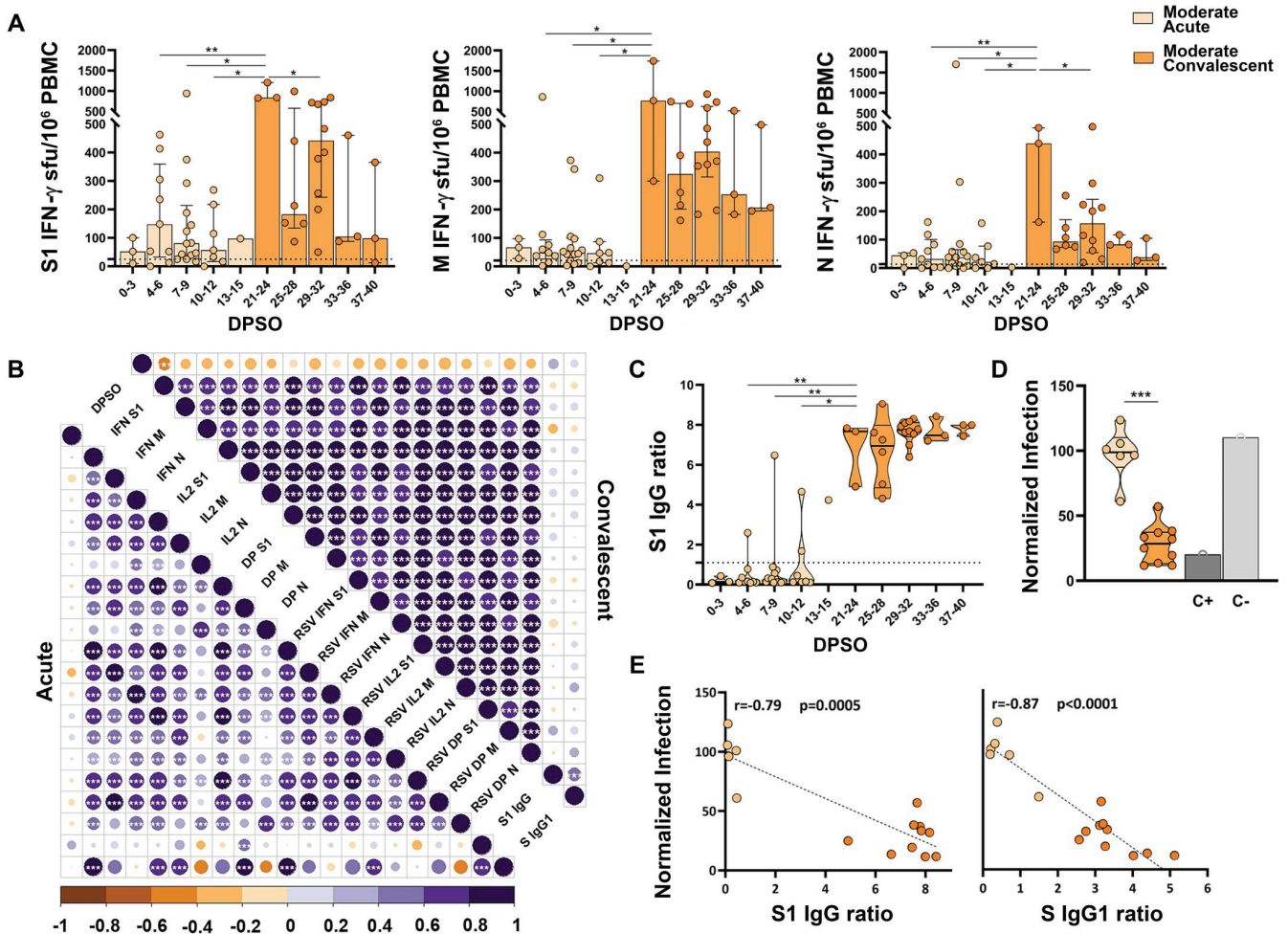
Severe patients had a remarkably low cellular immune response against all 3 proteins, within the first 2 weeks PSO (Figs 4A and S2), which did not correlate with DPSO either (Fig 4B). The development of the cellular response was very slow, as it had still not increased after a week of hospitalization (median of 24, 11 and 8 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC at ER and of 48, 25 and 33 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC after a week of hospitalization, for S1, M and N responses, respectively, Fig 4C). Detection of SARS-CoV-2-specific IgG upon arrival to ER was uneven: while most severe patients had undetectable IgG a few of them had already high levels (Fig 4D). During the first hospitalization week, approximately half of the patients with no antibodies developed them (Fig 4E), and those antibodies were highly neutralizing (Fig 4F). Severe patients



**Fig 2. Cellular and humoral immune responses in mild natural infection, during acute and convalescent phases.** (A) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N proteins according to the days post-symptom onset (DPSO). Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. Dashed lines represent the positivity cut-off established by using a non-infected control group: >25 sfu/10<sup>6</sup> PBMC for S1, >21 sfu/10<sup>6</sup> PBMC for M and >14 sfu/10<sup>6</sup> PBMC for N. (B) Correlation matrices of cellular and humoral immune variables analyzed. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are represented with asterisks. Positive correlations appear in purple, and negative correlations appear in orange. The size and the colour gradient of the circle corresponds to the magnitude of the correlation. (C) Results of SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA according to DPSO. Dashed line represents the established cut-off of positivity (ratio  $\geq 1.1$ ). (D) Neutralizing capacity of 1/500 diluted sera, tested with S protein-pseudotyped virus represented as percentage of normalized infection neutralized. (E) Correlation between neutralizing capacity and the semi-quantitative results of SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA (left) and anti-Spike IgG1 assessed by flow cytometry (right). Linear regressions were performed using Spearman's rank test. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney or Wilcoxon signed rank tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . RSV: Relative Spot Volume; DP: IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive sfu.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g002>

showed the strongest correlation between levels of antibodies and neutralizing response ( $r = -0.90$ ,  $p < 0.001$  for anti-S1 IgG, and  $r = -0.87$ ,  $p < 0.001$  for anti-Spike IgG1, Fig 4G). Eight of the 22 (36%) severe patients died during hospitalization. These patients who died had significantly lower cellular response against all 3 proteins (Fig 4H) and a trend towards lower humoral response (Fig 4I) than severe patients who survived. In summary, upon arrival to ER, severe patients showed a negative correlation between antibody levels and some compartments of the cellular response, which reflected a discoordination between both arms of the immune response and the dominance of the humoral over the cellular immunity (Fig 4B).

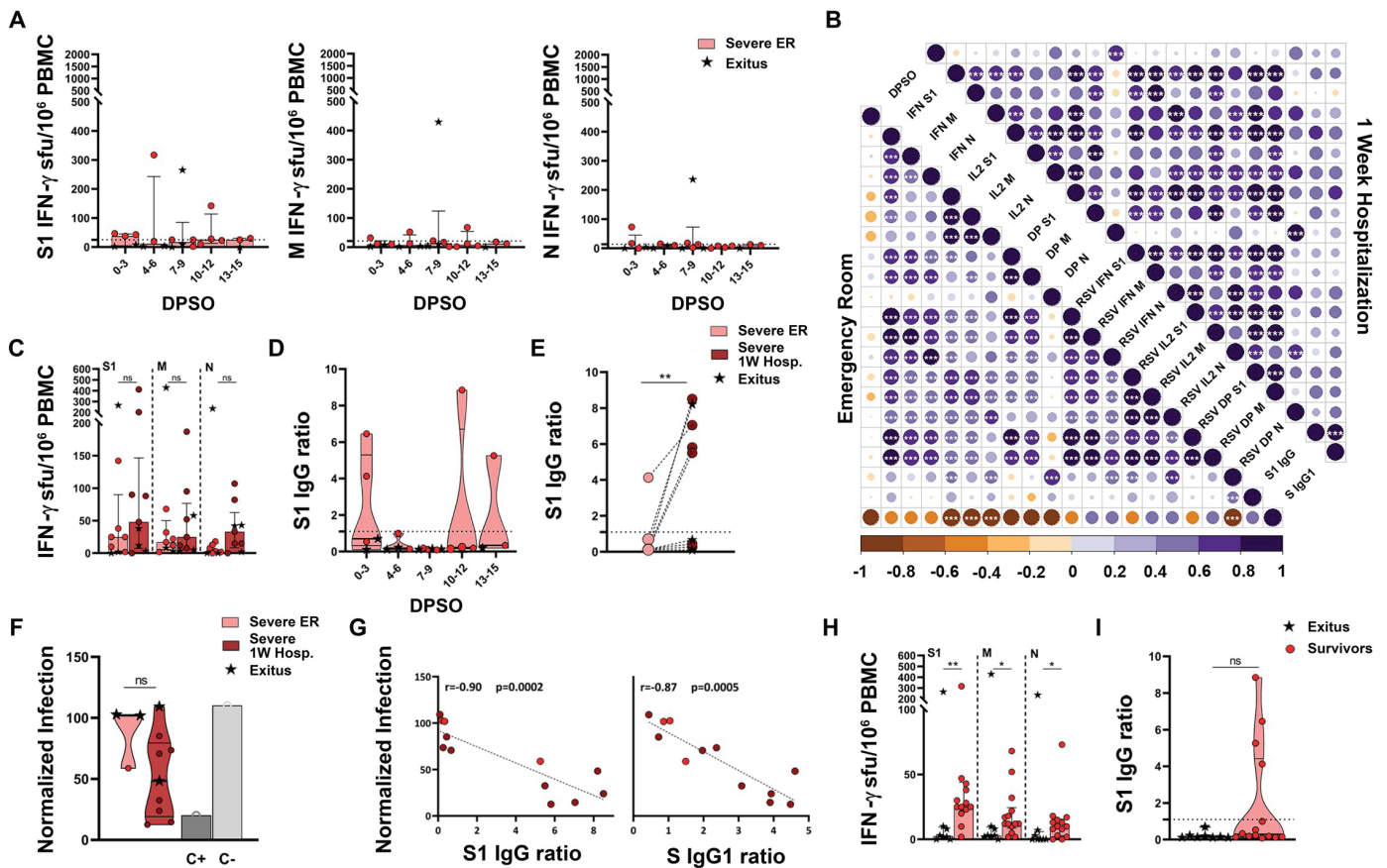


**Fig 3. Cellular and humoral immune responses in moderate natural infection, during acute and convalescent phases.** (A) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N proteins according to the days post-symptom onset (DPSO). Dashed lines represent the positivity cut-off established by using a non-infected control group:  $>25$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC for S1,  $>21$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC for M and  $>14$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC for N. (B) Correlation matrices of cellular and humoral immune response variables analyzed. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are represented with asterisks. (C) Results of SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA according to DPSO. (D) Neutralizing capacity tested with S protein-pseudotyped virus represented as percentage of normalized infection neutralized. (E) Correlation between neutralizing capacity and the semi-quantitative results of SARS-CoV-2 IgG ELISA (left) and anti-Spike IgG1 assessed by flow cytometry (right). Linear regressions were performed using Spearman's rank test. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney or Wilcoxon signed rank tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (See Fig 2 footnote for more detailed information).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g003>

### Association between dynamics of SARS-CoV-2-specific immune responses and COVID-19 severity

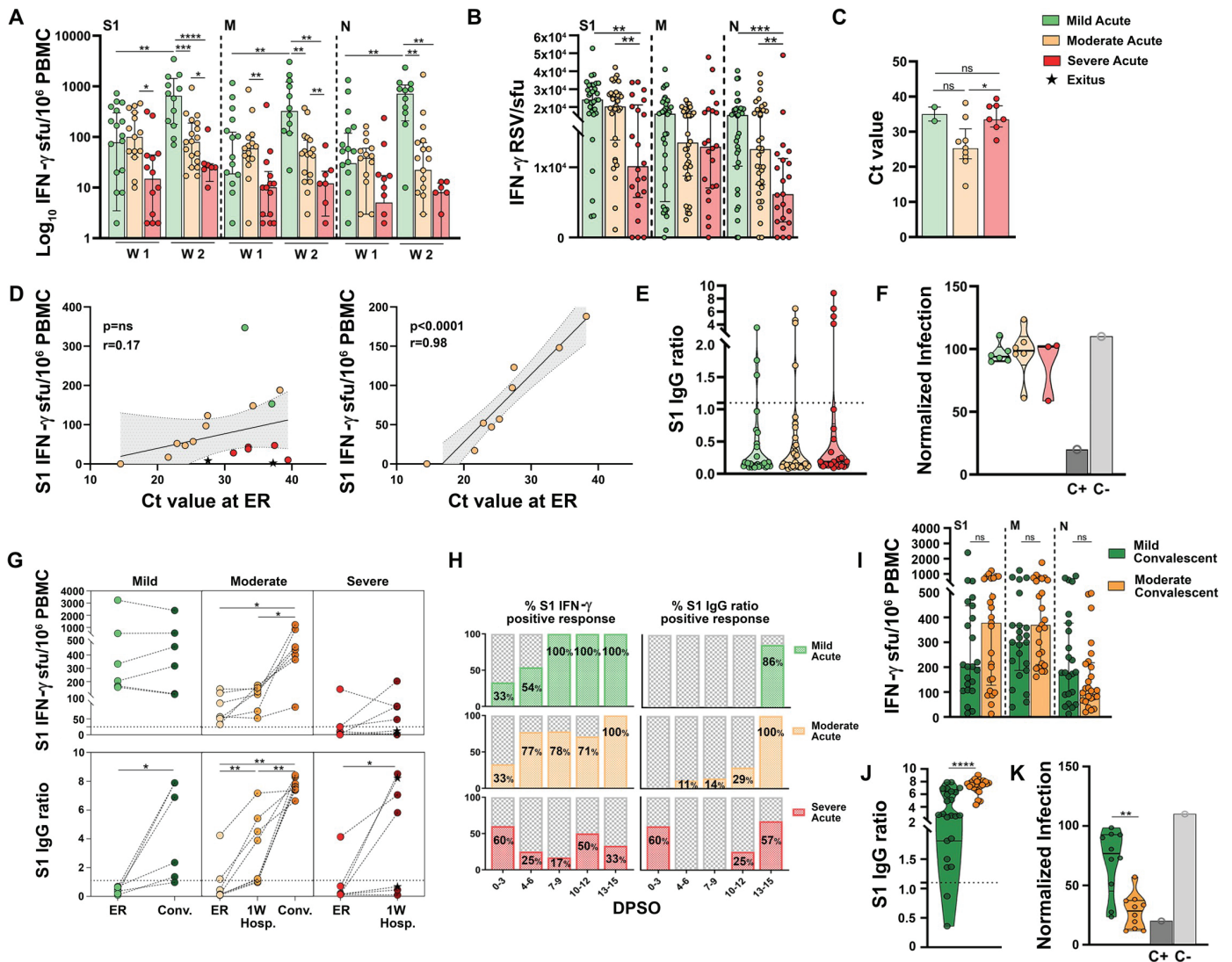
We next compared the dynamics of SARS-CoV-2 immunity among the 3 cohorts with different severity. Specific T cells started to increase in mild and moderate patients in the first week of symptoms, when they were barely detectable in severe patients. During the second week PSO, the cellular response developed robustly in mild patients with a significant increase between the two weeks ( $p < 0.01$ , Fig 5A), while it remained unchanged in moderate and severe patients. From the start of infection, we observed that the cellular response developed faster in mild patients, reaching their peak approximately 14 DPSO (Fig 2A), than in moderate patients, who reached their peak response a week later (Fig 3A). Nonetheless, the magnitude of the peak



**Fig 4. Cellular and humoral immune responses in severe natural infection, during acute phase, measured at emergency room (ER) and a week after hospitalization (1W Hosp.).** (A) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N proteins according to the days post-symptom onset (DPSO). Dashed lines represent the positivity cut-off established by using a non-infected control group:  $>25$  sfu/ $10^6$  PBMC for M and  $>14$  sfu/ $10^6$  PBMC for N. (B) Correlation matrices of cellular and humoral immune variables analyzed. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are represented with asterisks. (C) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N proteins at ER and a week after hospitalization. (D-E) Results of SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA according to DPSO. (F) Neutralizing capacity tested with S protein-pseudotyped virus represented as percentage of normalized infection neutralized. (G) Correlation between neutralizing capacity and the semi-quantitative results of SARS-CoV-2 IgG ELISA (left) and anti-Spike IgG1 assessed by flow cytometry (right). (H-I) Comparison of S1, M and N T-cell (H) and anti-S1 IgG (I) responses between survivor and non-survivor patients (black stars). Linear regressions were performed using Spearman's rank test. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (See Fig 2 footnote for more detailed information).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g004>

S1, M and N-specific cellular response was similar in mild and moderate patients. Severe patients, however, had not started developing high numbers of specific T cells by the end of the acute infection follow-up, by 21 DPSO (Fig 4C). In addition to developing specific T cell clones faster and in higher numbers, specific T cells from milder patients were more functional than those from severe patients, as shown by a higher amount of IFN- $\gamma$  and IL-2 secreted per clone (Figs 5B and S3). In our cohort, we did not observe an association between viral load at diagnosis and disease severity (Fig 5C). Nevertheless, we found a strong correlation, mostly in moderate patients ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.0001$ ), between a more potent specific T cell response and a higher Ct value at diagnosis, suggesting that patients with stronger specific T cell responses are more able to control viral replication (Fig 5D). These results confirm and further validate smaller studies which had indicated that the development of a functional T cell response is associated with mild disease.



**Fig 5. Association between dynamics of SARS-CoV-2-specific immune responses and COVID-19 severity.** (A) SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$ -producing T-cell responses reactive to the S1, M and N proteins in mild, moderate, and severe patients during the first (W1) and the second (W2) week post-symptom onset. (B) Relative Spot Volume (RSV) per spot of secreted IFN- $\gamma$  after S1, M and N peptide pool stimulation in mild, moderate, and severe patients during acute infection. (C) Ct values obtained on real time RT-PCR for detection of the E gene upon arrival to ER in mild, moderate and severe patients. A higher Ct value corresponded to a lower viral load. (D) Correlation between S1 IFN- $\gamma$ -producing T-cells and the relative viral load represented as Ct value at ER. (E) Semi-quantitative results of SARS-CoV-2 S1 IgG ELISA in the acute phase in mild, moderate, and severe patients. Dashed line represents the established cut-off of positivity (ratio  $\geq 1.1$ ). (F) Neutralizing capacity tested with S protein-pseudotyped virus represented as normalized infection. (G) Longitudinal data on the dynamics of cellular and humoral responses in six representative patients from the 3 severity cohorts. (H) Comparison of positive S1 cellular and humoral response during acute phase according to the days post symptom onset (DPSO) in mild, moderate and severe patients. (I) Comparison of IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N proteins between mild and moderate patients in convalescent phase. (J) Comparison of semi-quantitative results of SARS-CoV-2 S1 IgG between mild and moderate patients in convalescent phase. (K) Comparison of neutralizing capacity tested with S protein-pseudotyped virus represented as normalized infection. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. Linear regressions were performed using Spearman's rank test. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . ER: Emergency Room; Conv: Convalescence; 1W Hosp.: 1 Week Hospitalization; DPSO: Days post-symptom onset.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g005>

Both SARS-CoV-2-specific IgG and neutralization were mostly undetectable in all 3 cohorts during the first 2 weeks of symptoms (Fig 5E and 5F). The different dynamics of cellular and humoral immune response development are shown with 6 representative patients from each of the 3 cohorts in Fig 5G. On the whole, the adaptive immune response seemed to be more

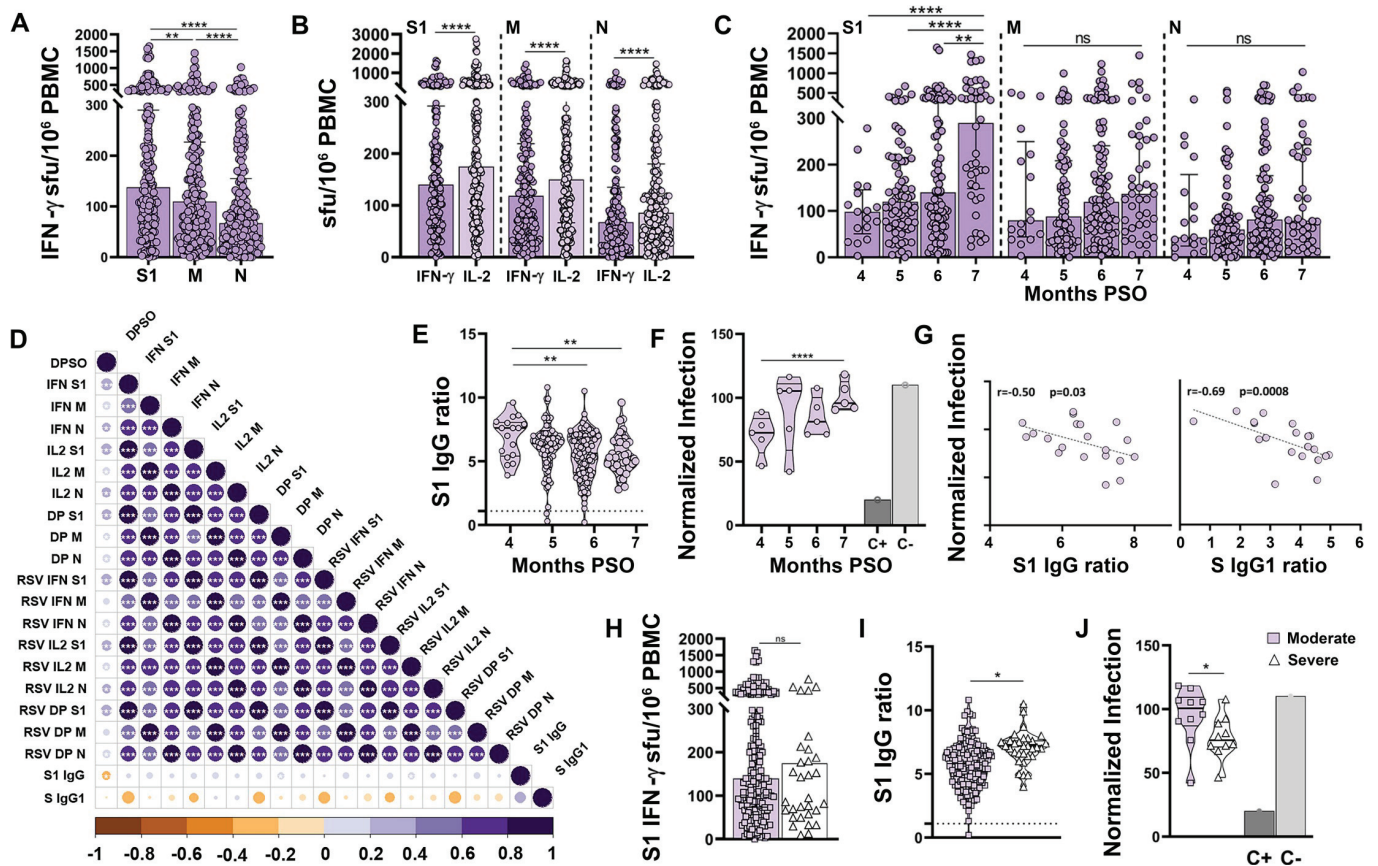
coordinated in mild and moderate patients, as most patients had developed a positive cellular response within the first 2 weeks PSO (23/32 [72%] and 26/34 [76%] respectively, [Fig 5H](#)), which was followed by the development of virus-specific IgG (86% mild and 100% moderate patients had detectable antibodies by day 13–15 PSO). Most severe patients, however, had not developed a positive SARS-CoV-2-specific cellular response within the first 2 weeks PSO, they lacked any correlation between positivity of the cellular response and DPSO when they attended the ER, and the development of virus-specific IgG did not follow a temporal pattern during acute infection ([Fig 5H](#)). By investigating if the SARS-CoV-2 specific cellular response could have a prognostic value, we found that a higher frequency of ER-measured specific T cells reduced the probability of developing severe COVID-19 (odds ratio [OR] per 100 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC increment: 0.45, 95%CI 0.20–0.76,  $p < 0.05$ ). Given that age and sex differed among mild, moderate and severe patients ([Table 1](#)), and that both older age and male sex have been associated with disease severity [[1–3](#)], we performed a multivariate analysis to test if the decreased risk of developing severe COVID-19 associated to high frequency of specific T cells could be influenced by these two variables. Independently of age and sex, the S1-specific cellular response measured at ER remained as a protective factor (OR per 100 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC increment: 0.47, 95%CI 0.20–0.87,  $p < 0.05$ ), while age and male sex appeared as independent COVID-19 severity risk factors (OR: 1.05, 95%CI 1.01–1.10,  $p = 0.01$  and OR: 5.02, 95%CI 1.31–26.07,  $p < 0.05$ , respectively).

During convalescence, there was no significant difference in the cellular response against all 3 proteins between mild and moderate patients ([Fig 5I](#)). On the contrary, antibodies were much higher in moderate than in mild patients ( $p < 0.0001$ , [Fig 5J](#)). Accordingly, mild patients showed modest neutralization capacity while moderate patients had a significantly more robust neutralizing response ( $p < 0.01$ , [Fig 5K](#)).

SARS-CoV-2 infection is known to cause lymphopenia, which associates with COVID-19 severity [[32,33](#)]. We found lymphopenia in acute moderate patients, mainly due to reduced T cells ([S1 Table](#)). There was a substantial decrease in CD4+ and CD8+ T cells, and a milder reduction in B cells. All lymphocyte populations recovered during convalescence. Severe patients had a profound lymphopenia during acute infection, with a reduction in CD4+, CD8+, B and NK cells. In addition, the overall T cell functionality was clearly reduced in severe patients when cells were polyclonally stimulated with anti-CD3/anti-CD28 ([S4 Fig](#)). We asked if the lymphopenia and/or the suboptimal global T cell response during acute infection could be responsible for the lack of SARS-CoV-2-specific T cells in severe patients. When we adjusted in each sample the specific cellular response by the number of sfu/10<sup>6</sup> PBMC after polyclonal stimulus, the results showed again how mild patients developed a significantly faster and more potent SARS-CoV-2-specific cellular response than hospitalized patients in the beginning of the acute infection ([S4 Fig](#)), suggesting that the profound lymphopenia and general reduction in T cell response in severe patients could only partially contribute to the lack of SARS-CoV-2-specific cellular response.

### Duration of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection

In order to assess the duration of adaptive immunity after natural infection, we analyzed the cohort of 234 COVID-19 recovered patients ([Fig 1A](#)). Most recovered patients maintained detectable virus-specific memory T cells, significantly more against S1 than M and N (median of 140, 117 and 75 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC respectively,  $p < 0.05$ , [Fig 6A](#)). In total, 227/234 (97%) patients maintained a cellular response against S1, M and/or N above the positivity threshold. Unlike in the acute and convalescent phase, the number of IFN- $\gamma$ - and IL-2-producing T cells differed in recovered patients. Six months PSO we detected significantly more IL-2-producing



**Fig 6. Duration of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection.** (A) S1, M and N cellular responses in recovered patients. (B) Comparison between IFN- $\gamma$  and IL-2-producing T-cell responses. (C) IFN- $\gamma$ -producing T-cell responses according to the months post-symptom onset (PSO). (D) Correlation matrix of cellular and humoral immune variables analyzed. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are represented with asterisks. (E) SARS-CoV-2 S1 IgG according to the months PSO. Dashed line represents the established cut-off of positivity (ratio  $\geq 1.1$ ). (F) Neutralizing capacity represented as normalized infection according to the months PSO. (G) Correlation between neutralizing capacity and the semi-quantitative results of SARS-CoV-2 IgG ELISA (left) and anti-Spike IgG1 measured by flow cytometry. (H-J) S1 IFN- $\gamma$ -producing T-cells (H), semi-quantitative results of SARS-CoV-2 S1 IgG (I) and neutralizing capacity (J) in recovered patients who suffered a moderate or severe acute disease. Linear regressions were performed using Spearman's rank test. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . RSV: Relative Spot Volume; DP: IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive sfu.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g006>

than IFN- $\gamma$ -producing clones (174 vs 140, 152 vs 117 and 92 vs 75 sfu/10<sup>6</sup> PBMC against S1, M and N, respectively, all  $p < 0.0001$ , Fig 6B). Moreover, we found an unexpected gradual increase in the cellular response from month 4 to month 7 PSO, which was significant for S1 ( $p < 0.01$  Fig 6C), and positive correlations between the cellular response and DP50 (Fig 6D). Recovered patients had normalized their lymphocyte populations (S1 Table), however they showed an increased polyclonal T cell response compared to healthy controls ( $p < 0.001$ , S5 Fig), which augmented with time after infection. After adjusting by the sfu/10<sup>6</sup> PBMC values of polyclonal responses, the increase in SARS-CoV-2-specific cellular response was considerably reduced, suggesting that the observed increase in SARS-CoV-2-specific cellular response from month 4 to 7 PSO was likely due to a general increment in T cell functionality rather than to a specific boost of cellular response (S5 Fig).

A robust humoral response anti-COVID-19 was still detected in recovered patients, as 99% (231/234) of them were positive for SARS-CoV-2-specific IgG. Contrarily to the cellular response, there was a gradual significant decline from month 4 to month 7 in antibodies

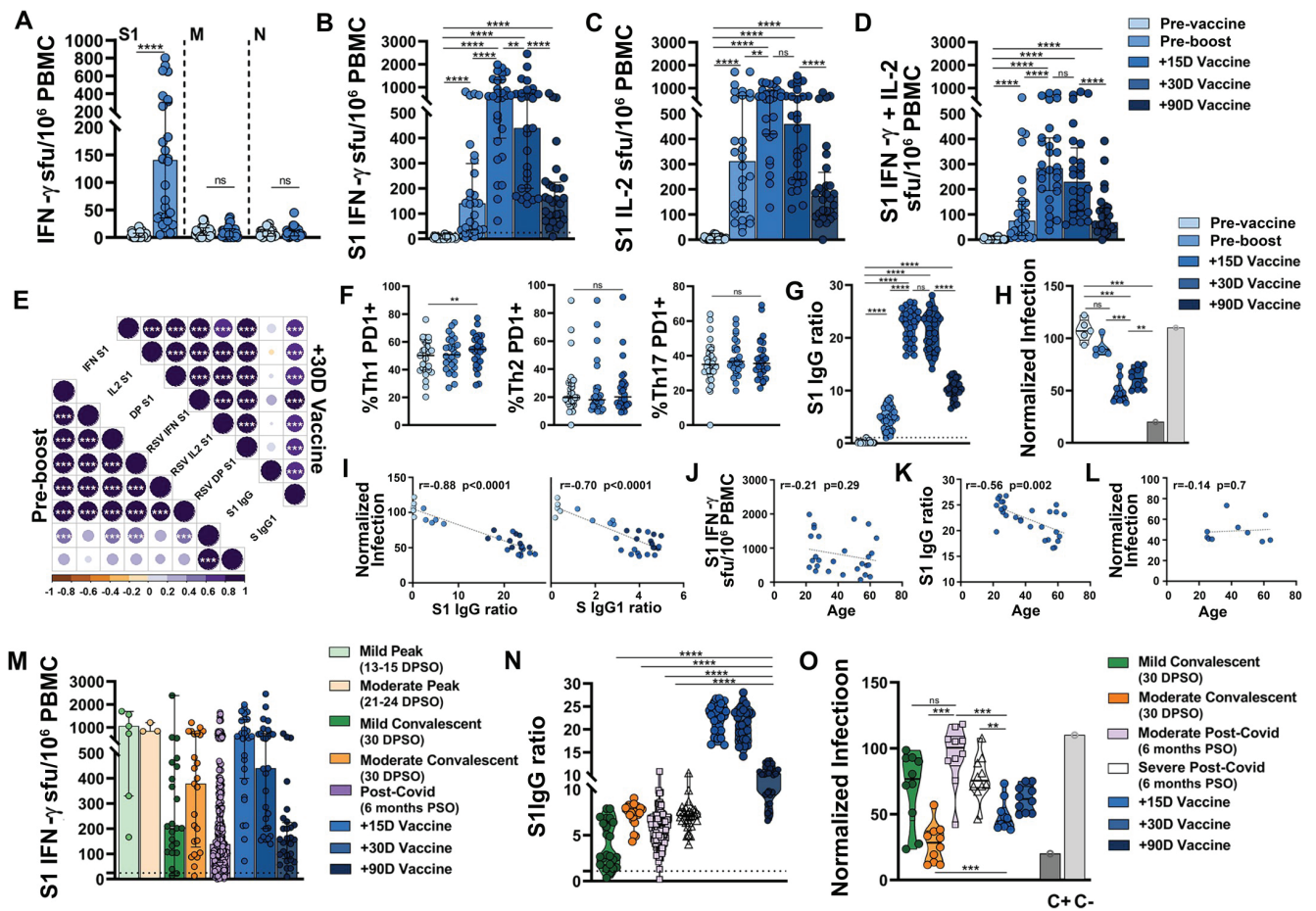
( $p < 0.01$ , Fig 6E) and neutralizing capacity ( $p < 0.0001$ , Fig 6F), and a negative correlation was observed between anti-S1 IgG levels and DPSO (Fig 6D). Antibody levels paralleled the neutralizing capacity ( $r = -0.50$ ,  $p < 0.05$  for anti-S1 IgG and  $r = -0.69$ ,  $p < 0.001$  for anti-Spike IgG1, Fig 6G), although these correlations were weaker than in acute and convalescent patients (Figs 2E, 3E and 4G).

There was no difference in memory cellular response between recovered patients who had suffered a moderate ( $N = 203$ ) or a severe ( $N = 31$ ) COVID-19 form (Fig 6H), while subjects recovered from severe COVID-19 maintained significantly higher antibody levels ( $p < 0.05$ , Fig 6I), with higher neutralization capacity ( $p < 0.05$ , Fig 6J). The absence of specific T cells in patients with acute severe infection (Fig 4), which were detectable in subjects recovered from severe COVID-19 suggests that severe patients may develop a specific cellular response sometime during convalescence.

### Development of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after BNT162b2 vaccination

We studied the development of the adaptive immunity after vaccination in a cohort of individuals naïve for SARS-CoV-2 infection. After the first vaccine dose, 82% (23/28) of vaccinees developed a positive cellular response, which as expected was specific against S1 (median of 140 IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC, Fig 7A). The administration of the second boost vaccine dose potentiated the cellular response, which peaked 2 weeks after full vaccination (median of 621 IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC) and then decreased steadily a month and three months post-vaccination (median of 439 and 158 IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC, respectively, Fig 7B). Despite this decrease, all vaccinees except one remained above the positivity threshold. A similar dynamic was observed in the development of IL-2-producing SARS-CoV-2-specific T cells and IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells (Fig 7C and 7D). There was a strong positive correlation between IFN- $\gamma$ , IL-2 and bifunctional T cell response, measured as the number of specific-T cell clones (sfu) and as the total amount of cytokine secreted (RSV) after the first and second vaccine doses (Fig 7E). Additionally, as reported in the phase I/II clinical trial for the vaccine candidate BNT162b1 [22], we confirmed that the BNT162b2 vaccine elicited exclusively Th1 T cell responses as noted by the increased frequency of CD4 Th1 PD1+, but not CD4 Th2 or CD4 Th17 PD1+, cells 2 weeks after full vaccination ( $p < 0.01$ , Fig 7F).

The development of anti-S1 antibodies after vaccination paralleled the dynamics of the cellular response. A single vaccine dose generated detectable IgG in 94% (26/28) of vaccinees (Fig 7G). Two weeks after completing vaccination, there were extremely high antibody levels in all individuals, which remained stable a month after vaccination. Three months after vaccination there was a stark decrease in IgG levels ( $p < 0.0001$ , Fig 7G), although all vaccinees remained well above the positivity threshold. As described by the vaccine trials [21,22], a single dose of vaccine was insufficient to develop neutralizing antibodies (Fig 7H). After the boost dose, sera from vaccinees were able to partially neutralize infection, although the neutralization capacity decreased already at a month, compared to two weeks, after full vaccination ( $p < 0.01$ , Fig 7H). Similar to natural infection, there was a correlation between levels of antibodies and neutralizing response ( $r = -0.88$ ,  $p < 0.0001$  for anti-S1 IgG, and  $r = -0.70$ ,  $p < 0.0001$  for anti-Spike IgG1, Fig 7I). Given the parallel cellular and humoral response to the vaccine, a month after full vaccination, there was a positive correlation between the two arms of the adaptive immunity (Fig 7E). While no relationship between age and magnitude of the cellular response was observed (Fig 7J), age negatively correlated with antibody levels ( $r = -0.56$ ,  $p < 0.01$ , Fig 7K), despite of which all vaccinees showed high levels of anti-S1 IgG, with no differences in neutralizing capacity among subjects of different ages (Fig 7L).



**Fig 7. Development of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after BNT162b2 vaccination.** (A) IFN- $\gamma$ -producing T-cell responses against S1, M and N proteins pre-vaccine and pre-boost. (B-D) S1 SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$  (B), IL-2 (C) and both cytokines (D) producing T-cells pre-vaccine, pre-boost and 15, 30 and 90 days after complete vaccination. Dashed line represents the positivity cut-off:  $>25$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC. (E) Correlation matrix of adaptive immune variables analyzed. Only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are represented with asterisks. (F) Frequency of CD4 Th1, Th2 and Th17 PD1+ cells pre-vaccine, pre-boost and 15 days after complete vaccination. Dashed line represents the positivity cut-off (ratio  $\geq 1.1$ ). (G) Anti-S1 IgG results pre-vaccine, pre-boost and 15, 30 and 90 days after complete vaccination. (H) Neutralization capacity pre-vaccine, pre-boost and 15 and 30 days after complete vaccination. (I) Correlation between neutralization and anti-S1 IgG (left) and anti-Spike IgG1 (right). (J-L) Correlation between age and S1 IFN- $\gamma$ -producing T-cells (J), anti-S1 IgG (K) and neutralization (L) 15 days after full vaccination when the vaccine-elicited immune response peaked. (M) Comparison of S1 T-cell response between SARS-CoV-2 natural infection and complete vaccination. (N-O) Comparison of anti-S1 IgG (N) and neutralization (O) between SARS-CoV-2 natural infection and complete vaccination. Linear regressions were performed using Spearman's rank test. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . DPSO: Days post symptom onset.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010211.g007>

### Comparison of SARS-CoV-2-specific immunity development after natural infection or real-world vaccination

Finally, we compared the magnitude and dynamics of the adaptive immune response after vaccination to that developed after natural infection. The peak of the cellular response 2 weeks after complete vaccination was comparable to the peak response in acute mild and moderate patients, 2 to 3 weeks PSO (Fig 7M). After the peak, the cellular response started to decline and 3 months after vaccination it was similar to that of COVID-19 recovered patients 4–7 months after infection. The production of anti-S1 IgG reached much higher levels in vaccinees than in naturally infected individuals, either convalescent or recovered patients, up to three months

post-vaccination ( $p < 0.0001$ , Fig 7N). However, the neutralization capacity of the antibodies elicited by the vaccine was relatively lower than that of antibodies elicited by the natural infection. Despite having higher levels of IgG, the neutralization capacity of vaccinees was intermediate between that of mild and moderate convalescent patients (Fig 7O).

## Discussion

Our analysis of cellular and humoral SARS-CoV-2-specific immunity in patients with varying degrees of COVID-19 severity indicates that SARS-CoV-2-specific T cells are essential for disease control and that the delayed mounting of SARS-CoV-2-specific cellular immune response is associated with severe infection course. In addition, we describe in real-world conditions the development of a robust, coordinated cellular and humoral immune response with the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine, up to three months after completing the 2-dose vaccination schedule.

To date, this is the largest study analyzing the SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immune response in patients upon ER arrival, which allowed the characterization of both arms of adaptive immunity from the start of natural infection without any interference from immunomodulatory medication. The timing in which the different responsive compartments of immunity appeared was crucial for determining the course of the infection. Patients who developed a prompt IFN- $\gamma$ - and IL-2-producing cellular response followed by antibody production had a mild COVID-19 course, an observation in agreement with the well-known concept that the early development of virus-specific T cells and the subsequent production of neutralizing antibodies are required for effective control of viral infections [34]. On the other extreme, patients who did not develop an early specific cellular response and initiated a humoral immune response with subsequent production of high levels of antibodies, were not able to eliminate the virus efficiently and developed severe symptoms. A strong humoral response in severe COVID-19 patients has already been reported [11,16,35]. We observed that the inadequate adaptive immune response developed in severe patients could be explained partially by the profound lymphopenia and general decline in the T cell response. However, it is likely that the differences observed in the adaptive immune response between mild, moderate and severe COVID-19 forms also derive from differences in the patients' initial innate immune response. In particular, type I interferons, which are important for anti-viral host defence and may be required to initiate cell-mediated immune responses [36], could be hindered by genetic defects or autoantibodies that have been associated with severe COVID-19 [37,38]. Antibodies, and their neutralizing capacity, were not associated with reduced disease severity in our acute patients, which was also observed in Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)-infected patients [39]. Antibodies which may not be efficient at clearing the acute viral infection, may well provide protection against infection when present before exposure to the virus [40,41].

In our study, robust antigen-specific cellular and IgG responses developed concomitantly after vaccination, unlike in natural infection. The fast and potent immunity triggered by this mRNA vaccine explains its high effectiveness in preventing SARS-CoV-2 infection in the real world [23,24]. As observed in the clinical trial by Sahin *et al.* [22], the BNT162b2 vaccine elicited higher antibody levels, although with inferior neutralizing capacity than those formed after suffering moderate COVID-19. A current concern is the immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccines in elderly. Our results in adults 22 to 64 years old show no negative impact of age in the cellular response elicited by the vaccine and a decrease in the amount of SARS-CoV-2-specific IgG, but not in neutralizing activity, associated with age. While some studies report weak humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in COVID-19 uninfected

nursing home residents [42], others show optimal antibody titers irrespective of age [43] and, more importantly, a reduction in SARS-CoV-2 infections in vaccinated elderly [44]. Finally, three months after complete vaccination, the SARS-CoV-2-specific cellular response was similar, and the antibody levels were higher than in COVID-19 recovered patients. This coincides with the recent report by Tan et al [45] in which a similar magnitude of T cell responses between the vaccinees and recovered patients was observed three months after vaccination or infection. It could therefore be speculated that the protection due to immunization would last similarly to that conferred by natural infection. Studies on the long-term immunogenicity and effectiveness of COVID-19 vaccines will be informative to design vaccination strategies in the future. So far, several publications have investigated the durability of vaccine-induced humoral responses up to 6 months after vaccination. A gradual and substantial decrease in IgG specific antibodies and neutralizing antibody levels has been reported through the first half a year post-vaccination [28,46,47], independently of having received the mRNA based BNT162b2 or the adenoviral vector-based ChAdOx1 nCoV-19 [48]. Both, BNT162b2-induced SARS-CoV-2 antibody and T-cell responses have been shown to experience a more important decline after 6 months in the elderly than in young health-care workers [49]. Although these observations support the recommendation for booster vaccinations, the effect of antibody waning needs to be clearly determined, as, importantly, specific memory B cells remain 6 months after the immunization [29] or after the natural infection, even in the absence of detectable neutralizing antibodies [50].

A robust SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity remained months after recovery. We initially observed an increase in SARS-CoV-2-specific T cells from month 4 to month 7 PSO, which paralleled the general increase in T cell functionality upon immune reconstitution following severe lymphopenia. The relativization of the specific response to the overall T cell function allowed a more accurate interpretation of the results obtained. Importantly, SARS-CoV-2-specific T cell immunity remained stable from month 4 to month 7, while specific IgG declined over this period. This information from recovered patients further supports our finding in acute infection that specific T cells are essential in infection control and will likely be essential for long-term COVID-19 protection. Furthermore, Sekine *et al.* [51] described the presence of SARS-CoV-2-specific T cells in seronegative exposed and convalescent individuals, implying that only measuring specific IgG may underestimate protection against COVID-19. In addition, recovered patients had significantly more IL-2-producing SARS-CoV-2-specific T cells than IFN- $\gamma$ -producing ones. The higher prevalence of IL-2-producing SARS-CoV-2-specific cell clones could support the predominance of CD4+, rather than CD8+, T lymphocytes as expression of immune memory in patients who overcome COVID-19 [35].

A limitation of this study is that the FluoroSpot method does not differentiate between CD4- and CD8-SARS-CoV-2-specific T cells. Further studies to understand the degree of each cell subset participation in the response after infection or vaccination will be important. It should also be noted that the T cell response was analyzed using peptides covering the S1 region, which contains the receptor binding domain, but the potential response against S2 region was not analyzed. In addition, we proposed that severe disease develops because of the lack of specific cellular response to contain the virus. Elucidating the mechanisms leading to the failure in mounting an early, robust immune response against SARS-CoV-2 in some patients may help to develop new therapies and improve their prognosis.

In summary, our results not only confirm that the prompt induction of SARS-CoV-2-specific T cells in naturally infected patients is essential for disease control, but also that the SARS-CoV-2 specific cellular response measured at ER has a prognostic value as it is an age- and sex-independent protective factor against developing severe COVID-19. In addition,

specific cellular responses remained stable in recovered patients and were present up to three months after vaccination. These results highlight the relevance of monitoring SARS-CoV-2-specific cellular immune responses, and not only antibody levels, for prognosis in natural infection, and as a correlate for protection after infection and after vaccination.

## Materials and methods

### Ethics statement

All participants were enrolled after signing the informed written consent of two studies approved by the institutional clinical research ethics committee (references 21/039 and 21/056).

### Study design

A total of 380 subjects were recruited at Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain). These subjects belonged to six different cohorts (see [Fig 1A](#) and Study design and participants section in Results). Natural infection was confirmed by a positive SARS-CoV-2 real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or a SARS-CoV-2 antigen test in all COVID-19 patients.

### FluoroSpot assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated by density-gradient centrifugation using Ficoll-Paque within a maximum of 12 hours from blood being drawn and were seeded in duplicate at 300,000 cells/well in IFN- $\gamma$  IL-2 FluoroSpot plates (MabTech). Cells were supplemented with 15-mer overlapping peptides covering the S1 domain of the S glycoprotein (SARS-CoV-2 S1 scanning pool, MabTech), the N protein (Epitope Mapping Peptide Set [EMPS] SARS-CoV-2 NCAP-1, JPT), and the M protein (EMPS SARS-CoV-2 VME1, JPT) at a final concentration of 1  $\mu$ g/mL. Negative control wells contained anti-CD28 mAb (1  $\mu$ g/mL) and positive control wells included anti-CD3 mAb (MabTech). Assays were incubated for 16–18 hours at 37°C. Spots were counted using an automated IRIS FluoroSpot Reader System (MabTech). To quantify antigen-specific responses, spots of the negative control wells were subtracted from the mean spots test wells, and the results were expressed as IFN- $\gamma$  or IL-2 producing spot forming units (sfu) per  $10^6$  PBMCs. Results were excluded if negative control wells had  $>80$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs or positive control wells had  $<400$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs. Responses were considered positive if the results were at least three times higher than the mean of the negative control wells and above of the following antigen-specific cut-off values:  $>25$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs for the S1 domain of the S glycoprotein,  $>14$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs for the N protein, and  $>21$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs for the M protein, as previously published [52].

### Anti-S1 IgG detection by ELISA

Serum SARS-CoV-2 IgG antibodies targeting the S1 protein were detected with the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Euroimmun AG, Lübeck, Germany) according to manufacturer's instructions. Optical density (OD) values were measured at 450 nm using the PR 3100 microplate reader (Bio-Rad Life Science, Marnes-La-Coquette, France). Results were evaluated semi-quantitatively by calculating the ratio of the OD value of the sample over the OD value of the calibrator (relative OD), with the following cut-off values: ratio  $<0.8$ : negative; ratio  $\geq 0.8$  to  $<1.1$ : borderline; and ratio  $\geq 1.1$ : positive.

### Anti-Spike IgG1 detection by flow cytometry

Jurkat cells co-expressing full-length Spike S protein of SARS-CoV2 and a truncated version of human EGFR (huEGFRt) as reporter were used to detect anti-spike IgG1 in human sera as described in Horndler et al[31]. Briefly, for each serum to test  $120 \times 10^3$  cells were stained with a 1/50 serum dilution followed by a secondary anti-human IgG1 PE (clone HP6001, Southern Biotech) and an anti-human EGFR Bv421 (clone AY13, BioLegend) and the viability marker 7AAD. Samples were analyzed on a FACSCanto II flow cytometer and FlowJo software (Becton-Dickinson). The IgG1 PE/EGFR Bv421 ratio was used to determine the relative amount of anti-spike IgG1 signal.

### Neutralization assay with pseudotyped virus

Neutralization assays were performed as described in Horndler et al[31]. Briefly, lentiviruses were produced by co-transfecting plasmids pCMV-dR (gag/pol), pHR SIN-GFP and a truncated S envelope (pCR3.1-St). A total of  $35 \times 10^3$  ACE2+ HEK293T cells per well in a 48-well plate were seeded the day before transduction. Serially diluted serum was incubated with viral supernatant for 1 h at 37°C prior addition to the cells. Polybrene (8 µg/ml) was added and plates were centrifuged for 70 min at 1,600 g and left in culture for 48 h and then were resuspended in PBS with 2% FBS and 5 mM EDTA and fixed with 2% paraformaldehyde. GFP+ cells were then analyzed on a FACSCanto II flow cytometer, and the data were analyzed with FlowJo software (Becton-Dickinson). Samples were run in duplicates and infection was normalized to 100% with viral supernatant without serum. A decrease in the neutralization capacity was observed as patient sera were serially diluted 1/50, 1/500 and 1/2000 (S6 Fig). The serum dilution 1/500 was chosen for comparison of neutralizing capacity between cohorts as it allowed the maximum discrimination. A known convalescent serum was used as positive control and a pre-pandemic serum was used as negative control.

### Viral load quantification

SARS-CoV-2 viral load at diagnosis was assessed using cycle threshold (Ct) values from a RT-PCR assay applied to nasopharyngeal swab samples. The RT-PCR assay was a laboratory-developed test (LDT) based on real time RT-PCR for detection of the E gene on the Panther Fusion Hologic (San Diego, CA, USA) using its open access functionality as previously described [53,54]. Amplification Ct values were considered a relative measure of viral load quantification. Lower Ct values corresponded with higher viral loads.

### Peripheral blood lymphocyte populations

EDTA-treated whole blood (50 µL) was stained with 20 µL of BD Multitest 6-color TBNK reagent in Trucount tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 15 min. After lysis of red blood cells, T, B and NK lymphocyte subsets were enumerated with a FACSCanto II flow cytometer, and data were analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences) [55].

For the analysis of T helper cell subsets after vaccination, EDTA-treated whole blood was incubated with: anti-CD3-PerCPy5.5 and anti-CD4-KO (Beckman Coulter); anti-CXCR3-PE, anti-CCR6-PB and anti-PD-1-PECy7 (BD Biosciences). Acquisition was performed with a Navios flow cytometer (Beckman Coulter), and data were analyzed with FlowJo software v10.6.2. Th1 cells were defined as CD4+CXCR3+CCR6-, Th2 cells as CD4+CXCR3-CCR6- and Th17 cells as CD4+CXCR3-CCR6+. PD-1 was considered as a recent activation marker.

## Statistical analysis

Quantitative data were shown as the median with IQR, and qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Non-parametric Mann-Whitney U or Wilcoxon signed-rank tests were applied for comparison within two groups, when necessary. Kruskal-Wallis test was used to compare three or more unmatched groups. Correlations between continuous variables were evaluated using Spearman's rank test. Operating characteristics (ROC) curve analysis was performed to determine positivity cut-off values for cellular response. Univariate and multivariate logistic regressions were performed to test association with disease severity. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software Inc, LaJolla, CA) and R software v4.0.3.

## Supporting information

**S1 Fig. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis and positivity cut-off values for S1, M and N cellular response.** Cut-off values were established by using a control group of 30 healthcare workers with no microbiological or clinical evidence of SARS-CoV-2 infection and 234 recovered COVID-19 patients. (A) S1 Cut-off  $>25$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC (AUC = 0.97, 95%CI = 0.95–0.99). (B) M Cut-off  $>21$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC (AUC = 0.97, 95%CI = 0.95–0.99). (C) N Cut-off  $>14$  IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMC (AUC = 0.96, 95%CI = 0.94–0.98). AUC: Area Under the Curve; IC: Confidence Interval. (TIF)

**S2 Fig. Representative T cell IFN- $\gamma$  FluoroSpot images.** FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N peptide pools and positive (anti-CD3 and anti-CD28 mAb) and negative (anti-CD28 mAb only) control wells for mild (A), moderate (B) and severe (C) patients. (TIF)

**S3 Fig. Development of SARS-CoV-2-specific cellular response in natural infection.** IL-2 and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 T cell responses against SARS-CoV-2 S1, M and N protein pools according to the days post symptom onset during acute and convalescent phase in mild (green) (A-B) moderate (orange) (C-D) and severe (red) (E-H) patients. Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. (I-K) Relative Spot Volume (RSV) per spot of secreted IL-2 after S1, M and N peptide pool stimulation in mild, moderate, and severe patients during acute infection. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (TIF)

**S4 Fig. Analysis of the SARS-CoV-2- specific cellular response relative to the overall T cell functionality.** (A) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against anti-CD3mAb polyclonal stimulus in mild (green), moderate (orange) and severe (red) COVID-19 patients. Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. (B-D) S1, M and N cellular response adjusted by anti-CD3 sfu/ $10^6$ PBMC normalization according to the days post symptom onset during acute and convalescent phase in mild (green), moderate (orange) and severe (red) COVID-19 patients. Data is shown as relative sfu per million PBMC. (E) Relative SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$ -producing T-cell responses reactive to the S1, M and N proteins in mild, moderate, and severe patients during the first (W1) and the second (W2) week post symptom onset.

Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  
(TIF)

**S5 Fig. Hyperactivation state of T cell after natural infection.** (A) Comparison of Fluoro-Spot IFN- $\gamma$  responses against anti-CD3mAb polyclonal stimulus in healthy controls (HC) and moderate or severe recovered patients (Post-COVID). (B) anti-CD3mAb IFN- $\gamma$  responses according to the months post symptom onset (PSO). (C) S1, M and N cellular response normalized by anti-CD3 sfu/ $10^6$ PBMC, according to the months PSO. Data is shown as relative sfu per million PBMC. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .  
(TIF)

**S6 Fig. Neutralization capacity triggered after natural infection and BNT162b2 vaccination.** Neutralization capacity represented as normalized infection achieved in the presence of 1/50, 1/500 and 1/2000 (from left to right) serum dilutions for each sample in (A) Mild COVID-19 patients; (B) Moderate COVID-19 patients (Mod); (C) Severe COVID-19 patients (Sev); (D) Moderate or severe COVID-19 recovered patients (Post) and (E) after BNT162b2 vaccination (Vac). Coding sample in natural infection, 1: acute phase; 2: hospitalization; 3: convalescent phase. Coding sample in vaccination, 1': pre-boost; 2': 15 days after complete vaccination; 3': 30 days after complete vaccination. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively.  
(TIF)

**S1 Table. Lymphocyte populations in successive phases of the disease according to severity.**  
(DOCX)

**S1 Raw Data. Data base including all numerical values that were used to generate graphs and statistics.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

We would like to thank all patients, nurses, medical colleagues and healthy volunteers who contributed to the study.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Jose Maria Aguado, Estela Paz-Artal.

**Formal analysis:** Patricia Almendro-Vázquez, Alberto Utrero-Rico, Pilar Delgado, Francisco Javier Gil-Etayo, Balbino Alarcon.

**Funding acquisition:** Jose Maria Aguado, Estela Paz-Artal.

**Investigation:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Alberto Utrero-Rico, Pilar Delgado, Miguel Moreno-Batanero, Marta Chivite-Lacaba, Francisco Javier Gil-Etayo, Carmen Martín-Higuera, María Ángeles Meléndez-Carmona, Irene Arellano, Luis Miguel Allende.

**Methodology:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Miguel Moreno-Batanero, Estela Paz-Artal.

**Project administration:** Jose Maria Aguado, Estela Paz-Artal.

**Resources:** Maria Ruiz-Ruigomez, Antonio Lalueza, Guillermo Maestro de la Calle, Pilar Delgado, Luis Perez-Ordoño, Eva Muro, Juan Vila, Isabel Zamarron, Carlos Lumbreras, Balbino Alarcon, Luis Miguel Allende, Jose Maria Aguado, Estela Paz-Artal.

**Supervision:** Rocio Laguna-Goya, Estela Paz-Artal.

**Visualization:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Alberto Utrero-Rico, Pilar Delgado.

**Writing – original draft:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Estela Paz-Artal.

**Writing – review & editing:** Patricia Almendro-Vázquez, Rocio Laguna-Goya, Maria Ruiz-Ruigomez, Alberto Utrero-Rico, Antonio Lalueza, Guillermo Maestro de la Calle, Pilar Delgado, Luis Perez-Ordoño, Eva Muro, Juan Vila, Isabel Zamarron, Miguel Moreno-Batanero, Marta Chivite-Lacaba, Francisco Javier Gil-Etayo, Carmen Martín-Higuera, María Ángeles Meléndez-Carmona, Carlos Lumbreras, Irene Arellano, Balbino Alarcon, Luis Miguel Allende, Jose Maria Aguado, Estela Paz-Artal.

## References

1. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229):1054–62. Epub 2020/03/15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3) PMID: 32171076
2. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507–13. Epub 2020/02/03. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7) PMID: 32007143
3. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *Jama*. 2020; 323(20):2052–9. Epub 2020/04/23. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6775> PMID: 32320003
4. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Moller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020. Epub 2020/05/18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026> PMID: 32416070
5. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020; 584(7821):463–9. Epub 2020/07/28. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y> PMID: 32717743
6. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Science immunology*. 2020; 5(49). Epub 2020/07/17. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd7114> PMID: 32669287
7. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020; 369(6504):718–24. Epub 2020/07/15. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027> PMID: 32661059
8. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020; 368(6490):473–4. Epub 2020/04/19. <https://doi.org/10.1126/science.abb8925> PMID: 32303591
9. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nature immunology*. 2020; 21(11):1336–45. Epub 2020/09/06. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6> PMID: 32887977
10. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, Verma K, Long HM, Begum J, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nature immunology*. 2021. Epub 2021/03/07.
11. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021; 371(6529). Epub 2021/01/08. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063> PMID: 33408181

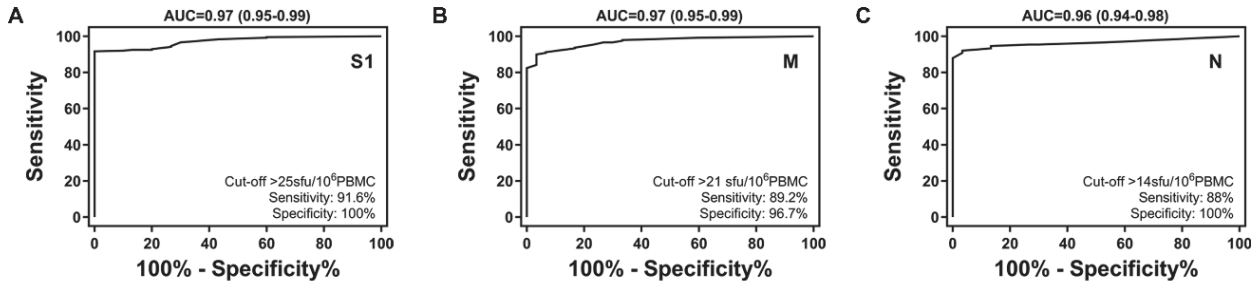
12. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 2020; 52(6):971–7 e3. Epub 2020/05/16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023> PMID: 32413330
13. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181(7):1489–501 e15. Epub 2020/05/31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015> PMID: 32473127
14. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020; 584(7821):457–62. Epub 2020/07/16. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z> PMID: 32668444
15. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020; 183(4):996–1012 e19. Epub 2020/10/05. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038> PMID: 33010815
16. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell reports*. 2021; 34(6):108728. Epub 2021/02/01. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108728> PMID: 33516277
17. Zhou R, To KK, Wong YC, Liu L, Zhou B, Li X, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity*. 2020; 53(4):864–77 e5. Epub 2020/08/14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.026> PMID: 32791036
18. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature medicine*. 2020; 26(6):845–8. Epub 2020/05/01. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1> PMID: 32350462
19. Wang Y, Zhang L, Sang L, Ye F, Ruan S, Zhong B, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *The Journal of clinical investigation*. 2020; 130(10):5235–44. Epub 2020/07/08. <https://doi.org/10.1172/JCI138759> PMID: 32634129
20. Lucas C, Klein J, Sundaram ME, Liu F, Wong P, Silva J, et al. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nature medicine*. 2021. Epub 2021/05/07.
21. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine*. 2020; 383(27):2603–15. Epub 2020/12/11. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577> PMID: 33301246
22. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020; 586(7830):594–9. Epub 2020/10/01. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7> PMID: 32998157
23. Benenson S, Oster Y, Cohen MJ, Nir-Paz R. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine Effectiveness among Health Care Workers. *The New England journal of medicine*. 2021. Epub 2021/03/24. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2101951> PMID: 33755373
24. Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner HL, Yoon SK, Meece J, et al. Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers—Eight U.S. Locations, December 2020–March 2021. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2021; 70(13):495–500. Epub 2021/04/02. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7013e3> PMID: 33793460
25. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Science immunology*. 2021; 6(59). Epub 2021/05/27.
26. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naive and recovered individuals following mRNA vaccination. *Science immunology*. 2021; 6(58). Epub 2021/04/17.
27. Mazzoni A, Di Lauria N, Maggi L, Salvati L, Vanni A, Capone M, et al. First-dose mRNA vaccination is sufficient to reactivate immunological memory to SARS-CoV-2 in recovered COVID-19 subjects. *The Journal of clinical investigation*. 2021. Epub 2021/05/04.
28. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *The New England journal of medicine*. 2021. Epub 2021/10/07. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114583> PMID: 34614326
29. Ciabattini A, Pastore G, Fiorino F, Polvere J, Lucchesi S, Pettini E, et al. Evidence of SARS-CoV-2-Specific Memory B Cells Six Months After Vaccination With the BNT162b2 mRNA Vaccine. *Frontiers in immunology*. 2021; 12:740708. Epub 2021/10/16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.740708> PMID: 34650563

30. (WHO) WHO. Novel Coronavirus: COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. [https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/COVID-19\\_Treatment\\_Trial\\_Design\\_Master\\_Protocol\\_synopsis\\_Final\\_18022020pdf](https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/COVID-19_Treatment_Trial_Design_Master_Protocol_synopsis_Final_18022020pdf). 2020.
31. Horndler L, Delgado P, Abia D, Balabanov I, Martinez-Fleta P, Cornish G, et al. Flow cytometry multiplexed method for the detection of neutralizing human antibodies to the native SARS-CoV-2 spike protein. *EMBO molecular medicine*. 2021; 13(3):e13549. Epub 2021/01/21. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013549> PMID: 33471406
32. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223):497–506. Epub 2020/01/28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5) PMID: 31986264
33. Laguna-Goya R, Utrero-Rico A, Talayero P, Lasa-Lazaro M, Ramirez-Fernandez A, Naranjo L, et al. IL-6-based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2020; 146(4):799–807 e9. Epub 2020/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.07.009> PMID: 32710975
34. Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010; 125(2 Suppl 2):S3–23. Epub 2010/03/05. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980> PMID: 20176265
35. Bonifacius A, Tischer-Zimmermann S, Dragon AC, Gussarow D, Vogel A, Krettek U, et al. COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity*. 2021; 54(2):340–54 e6. Epub 2021/02/11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.008> PMID: 33567252
36. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews Immunology*. 2015; 15(2):87–103. Epub 2015/01/24. <https://doi.org/10.1038/nri3787> PMID: 25614319
37. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020; 370(6515). Epub 2020/09/26.
38. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020; 370(6515). Epub 2020/09/26. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585> PMID: 32972996
39. Sariol A, Perlman S. Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity*. 2020; 53(2):248–63. Epub 2020/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.005> PMID: 32717182
40. Yu J, Tostanoski LH, Peter L, Mercado NB, McMahan K, Mahrokhian SH, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505):806–11. Epub 2020/05/22. <https://doi.org/10.1126/science.abc6284> PMID: 32434945
41. Deng W, Bao L, Liu J, Xiao C, Xue J, Lv Q, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505):818–23. Epub 2020/07/04. <https://doi.org/10.1126/science.abc5343> PMID: 32616673
42. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2021. Epub 2021/04/08. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab300> PMID: 33825869
43. Salmeron Rios S, Mas Romero M, Cortes Zamora EB, Taberner Sahuquillo MT, Romero Rizos L, Sanchez-Jurado PM, et al. Immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in frail or disabled nursing home residents: COVID-A study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2021. Epub 2021/03/27.
44. Rossman H, Shilo S, Meir T, Gorfine M, Shalit U, Segal E. COVID-19 dynamics after a national immunization program in Israel. *Nature medicine*. 2021. Epub 2021/04/21. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01337-2> PMID: 33875890
45. Tan AT, Lim JM, Le Bert N, Kunasegaran K, Chia A, Qui MD, et al. Rapid measurement of SARS-CoV-2 spike T cells in whole blood from vaccinated and naturally infected individuals. *The Journal of clinical investigation*. 2021; 131(17). Epub 2021/10/09.
46. Bayart JL, Douxfils J, Gillot C, David C, Mullier F, Elsen M, et al. Waning of IgG, Total and Neutralizing Antibodies 6 Months Post-Vaccination with BNT162b2 in Healthcare Workers. *Vaccines*. 2021; 9(10). Epub 2021/10/27. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101092> PMID: 34696200
47. Terpos E, Karalis V, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Gumeni S, Malandrakis P, et al. Robust Neutralizing Antibody Responses 6 Months Post Vaccination with BNT162b2: A Prospective Study in 308 Healthy Individuals. *Life (Basel)*. 2021; 11(10). Epub 2021/10/24. <https://doi.org/10.3390/life11101077> PMID: 34685448
48. Shrotri M, Navaratnam AMD, Nguyen V, Byrne T, Geismar C, Fragaszy E, et al. Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1. *Lancet*. 2021; 398(10298):385–7. Epub 2021/07/19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01642-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01642-1) PMID: 34274038

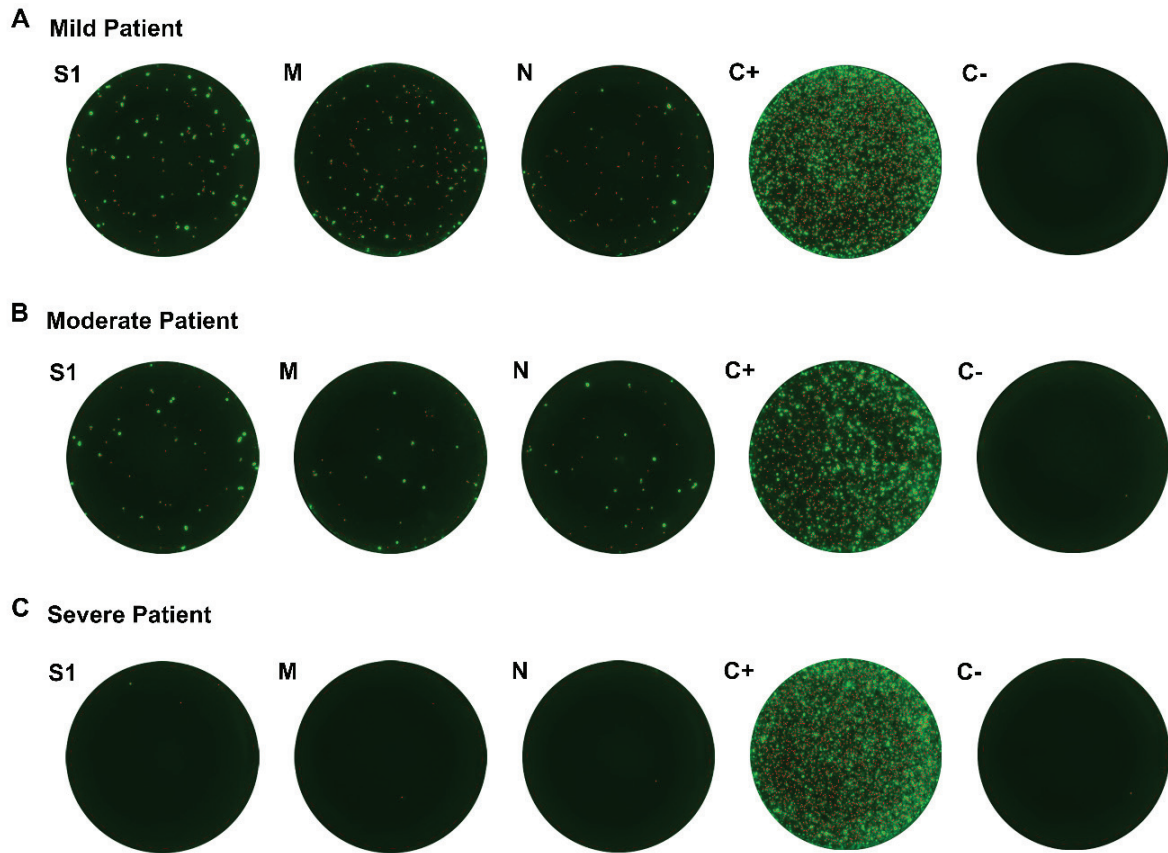
49. Tober-Lau P, Schwarz T, Vanshylla K, Hillus D, Gruell H, Suttorp N, et al. Long-term immunogenicity of BNT162b2 vaccination in older people and younger health-care workers. *The Lancet Respiratory medicine*. 2021; 9(11):e104–e5. Epub 2021/10/24. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00456-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00456-2) PMID: [34687656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34687656/)
50. Jeffery-Smith A, Burton AR, Lens S, Rees-Spear C, Davies J, Patel M, et al. SARS-CoV-2-specific memory B cells can persist in the elderly who have lost detectable neutralising antibodies. *The Journal of clinical investigation*. 2021. Epub 2021/11/30.
51. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Stralin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020; 183(1):158–68 e14. Epub 2020/09/28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017> PMID: [32979941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32979941/)
52. Fernandez-Ruiz M, Olea B, Almendro-Vazquez P, Gimenez E, Marcacuzco A, San Juan R, et al. T cell-mediated response to SARS-CoV-2 in liver transplant recipients with prior COVID-19. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2021. Epub 2021/06/07.
53. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020; 25(3). Epub 2020/01/30.
54. Cordes AK, Heim A. Rapid random access detection of the novel SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2, previously 2019-nCoV) using an open access protocol for the Panther Fusion. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020; 125:104305. Epub 2020/03/07. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104305> PMID: [32143123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143123/)
55. Molina M, Allende LM, Ramos LE, Gutierrez E, Pleguezuelo DE, Hernandez ER, et al. CD19(+) B-Cells, a New Biomarker of Mortality in Hemodialysis Patients. *Frontiers in immunology*. 2018; 9:1221. Epub 2018/07/03. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01221> PMID: [29963040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29963040/)



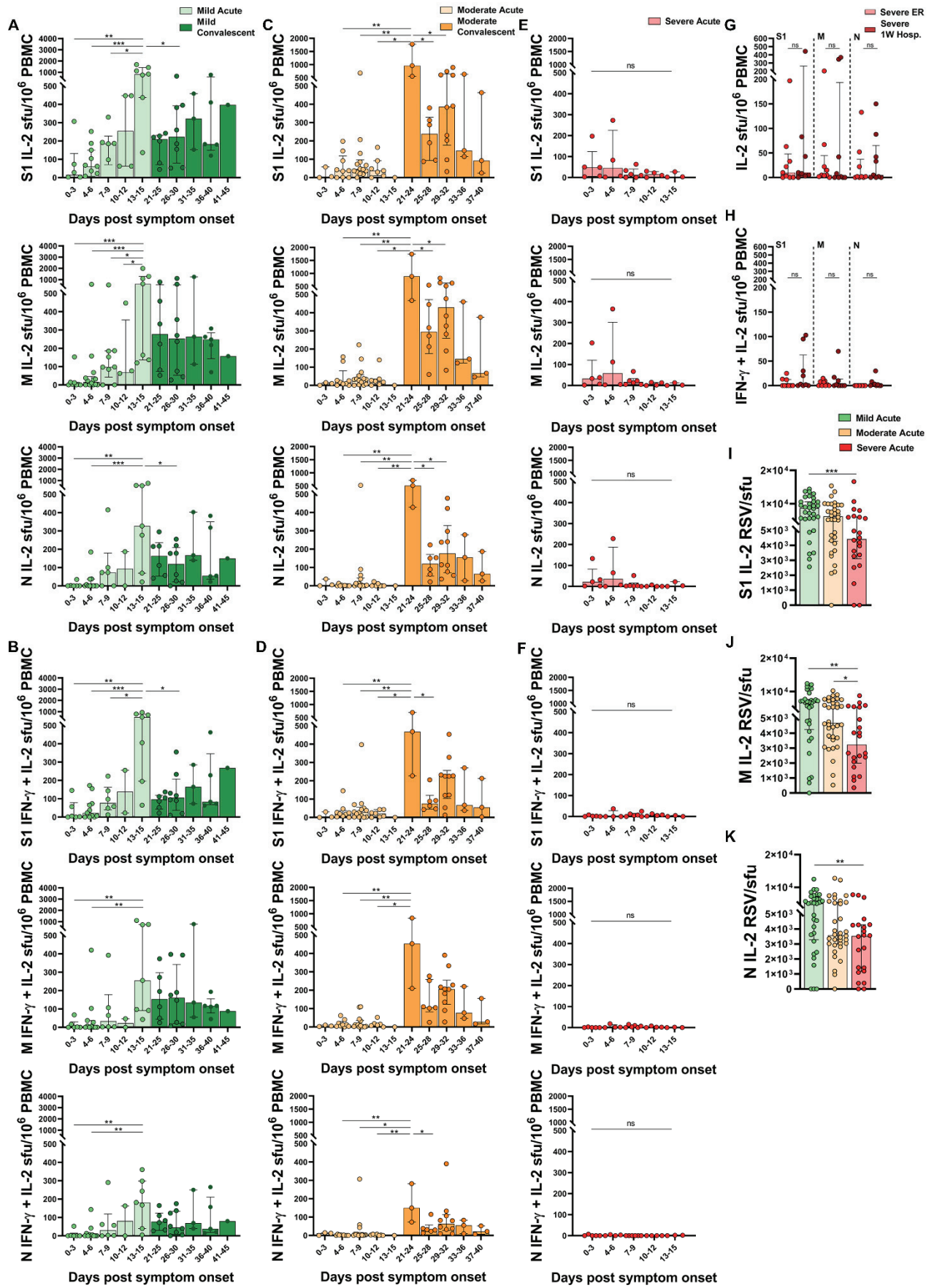
## SUPPLEMENTARY MATERIAL



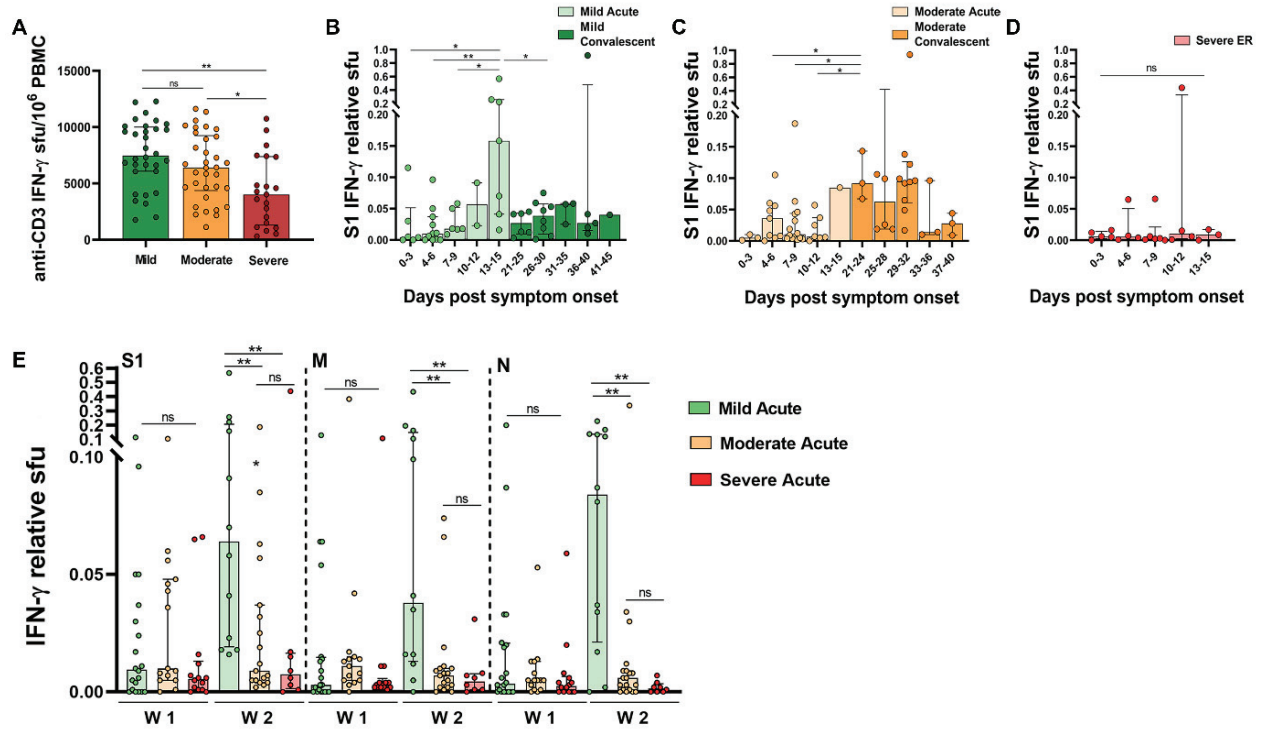
**Fig. S1. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis and positivity cut off values for S1, M and N cellular response.** Cut-off values were established by using a control group of 30 healthcare workers with no microbiological or clinical evidence of SARS-CoV-2 infection and 234 recovered COVID-19 patients. (A) S1 Cut-off >25 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC (AUC=0.97, 95%CI=0.95-0.99). (B) M Cut-off >21 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC (AUC=0.97, 95%CI=0.95-0.99). (C) N Cut-off >14 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMC (AUC=0.96, 95%CI=0.94-0.98). AUC: Area Under the Curve; IC: Confidence Interval.



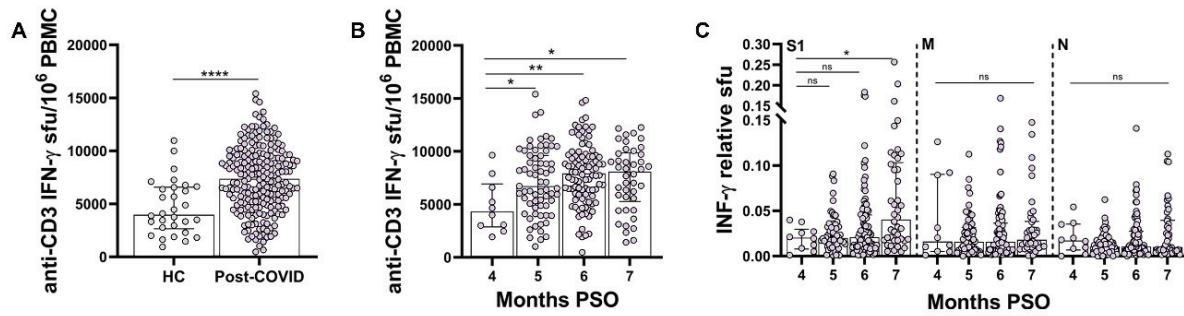
**Fig. S2. Representative T cell IFN- $\gamma$  FluoroSpot images.** FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against SARS-CoV-2 S1, M and N peptide pools and positive (anti-CD3 and anti-CD28 mAb) and negative (anti-CD28 mAb only) control wells for mild (A), moderate (B) and severe (C) patients.



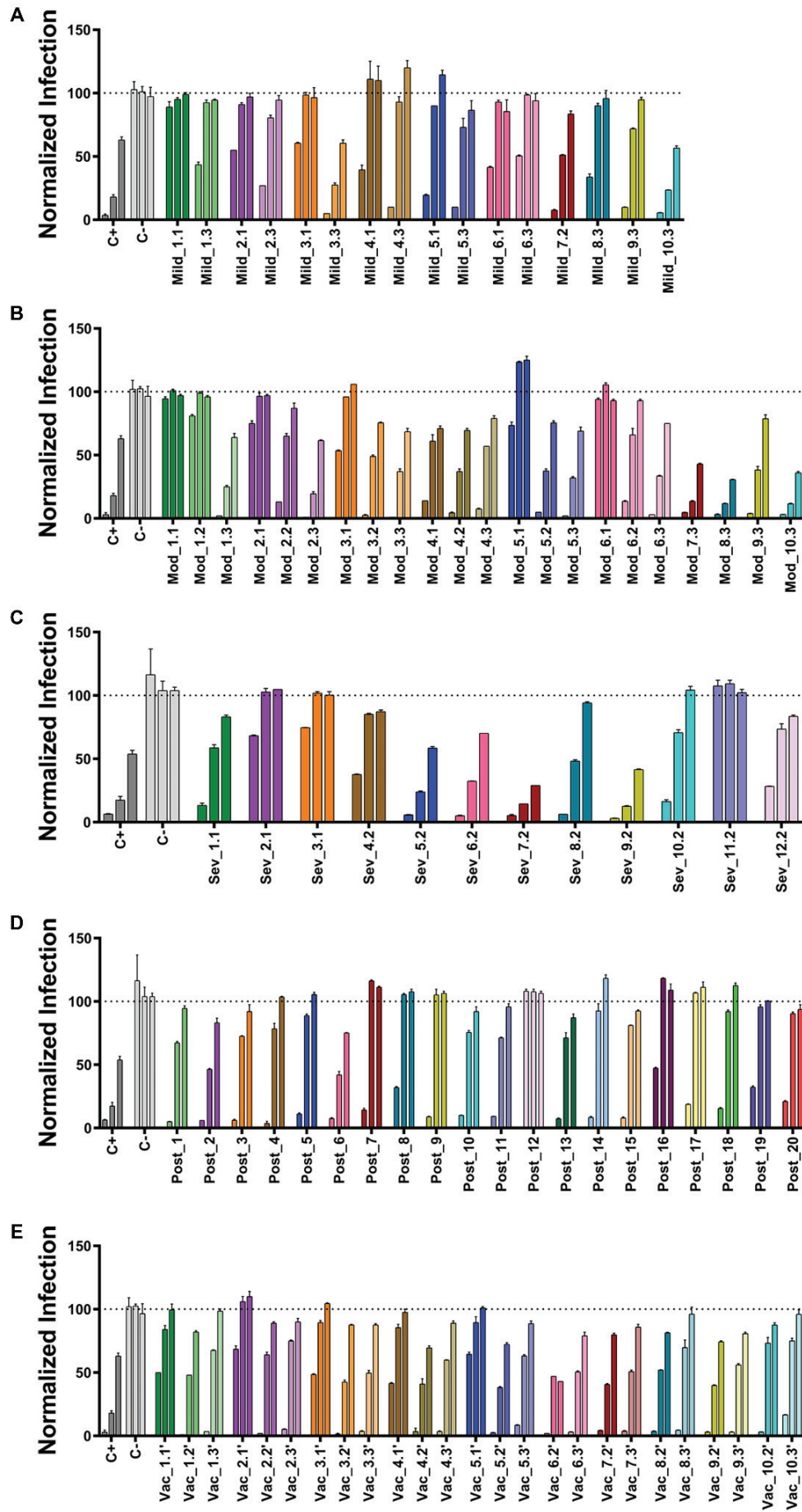
**Fig. S3. Development of SARS-CoV-2-specific cellular response in natural infection.** IL-2 and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 T cell responses against SARS-CoV-2 S1, M and N protein pools according to the days post symptom onset during acute and convalescent phase in mild (green) (A-B) moderate (orange) (C-D) and severe (red) (E-H) patients. Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. (I-K) Relative Spot Volume (RSV) per spot of secreted IL-2 after S1, M and N peptide pool stimulation in mild, moderate, and severe patients during acute infection. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Fig. S4. Analysis of the SARS-CoV-2- specific cellular response relative to the overall T cell functionality.** (A) FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against anti-CD3mAb polyclonal stimulus in mild (green), moderate (orange) and severe (red) COVID-19 patients. Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. (B-D) S1, M and N cellular response adjusted by anti-CD3 sfu/10<sup>6</sup>PBMC normalization according to the days post symptom onset during acute and convalescent phase in mild (green), moderate (orange) and severe (red) COVID-19 patients. Data is shown as relative sfu per million PBMC. (E) Relative SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$ -producing T-cell responses reactive to the S1, M and N proteins in mild, moderate, and severe patients during the first (W1) and the second (W2) week post symptom onset. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001.



**Fig. S5. Hyperactivation state of T cell after natural infection.** (A) Comparison of FluoroSpot IFN- $\gamma$  responses against anti-CD3mAb polyclonal stimulus in healthy controls (HC) and moderate or severe recovered patients (post-COVID). (B) anti-CD3mAb IFN- $\gamma$  responses according to the months post symptom onset (PSO). (C) S1, M and N cellular response normalized by anti-CD3 sfu/10<sup>6</sup>PBMC, according to the months PSO. Data is shown as relative sfu per million PBMC. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Fig. S6. Neutralization capacity triggered after natural infection and BNT162b2 vaccination.** Neutralization capacity represented as normalized infection achieved in the presence of 1/50, 1/500 and 1/2000 (from left to right) serum dilutions for each sample in (A) Mild COVID-19 patients; (B) Moderate COVID-19 patients (Mod); (C) Severe COVID-19 patients (Sev); (D) Moderate or severe COVID-19 recovered patients (Post) and (E) after BNT162b2 vaccination (Vac). Coding sample in natural infection, 1: acute phase; 2: hospitalization; 3: convalescent phase. Coding sample in vaccination, 1': pre-boost; 2': 15 days after complete vaccination; 3': 30 days after complete vaccination. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively.

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1. Lymphocyte populations in successive phases of the disease according to severity**

Disease course/severity		Acute phase					
		CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	B	NK
<b>Mild</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	1533 (1292-1820)	662 (575-894)	386 (259-443)	1.72	157 (110-232)	197 (153-250)
	% (IQR)	75% (71-80%)	47% (43-50%)	24% (20-27%)		10.3% (9-13%)	13% (9-16%)
<b>Moderate</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	817 (645-1154)	328 (220-437)	185 (130-266)	1.78	99 (67-113)	161 (78-296)
	% (IQR)	67% (60-72%)	37% (30-48%)	23% (17-29%)		11% (8-15%)	18% (12-27%)
<b>Severe</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	437 (103-629)	251 (68-341)	177 (35-204)	1.42	102 (22-133)	80 (48-140)
	% (IQR)	59% (51-70%)	39% (29-40%)	21% (20-23%)		12.8% (11-16%)	15.4% (11-20%)
<b>Count (cell/<math>\mu</math>l) p-value</b>		<0.0001	<0.0001	0.0002		0.003	0.02
Disease course/severity		Convalescent phase					
		CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	B	NK
<b>Mild</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	2001 (1790-2816)	864 (1006-2046)	499 (419-710)	1.73	246 (162-361)	263 (197-342)
	% (IQR)	76% (69-78%)	45% (41-51%)	25% (22-29%)		12% (10-15%)	13% (10-15%)
<b>Moderate</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	1553 (1153-1921)	621 (480-756)	372 (285-480)	1.67	154 (85-213)	248 (146-379)
	% (IQR)	70% (64-75%)	40% (34-44%)	26% (20-29%)		8% (7-14%)	18% (13-23%)
<b>Count (cell/<math>\mu</math>l) p-value</b>		0.001	0.003	0.08		0.006	0.7
Disease course/severity		Recovered					
		CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	B	NK
<b>Moderate</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	1353 (1052-1677)	786 (593-1034)	467 (350-696)	1.69	186 (128-274)	337 (204-487)
	% (IQR)	71% (65-76%)	41% (35-47%)	26% (20-32%)		9.8% (8-13%)	17.5% (12-24%)
<b>Severe</b>	Median cell/ $\mu$ l (IQR)	1419 (1169-1746)	757 (673-914)	566 (391-808)	1.60	223 (158-291)	398 (198-559)
	% (IQR)	70% (48-74%)	39% (29-45%)	25% (22-34%)		11% (8-14%)	17.3% (13-24%)
<b>Count (cell/<math>\mu</math>l) p-value</b>		0.5	0.7	0.09		0.2	0.4
<b>Normal Range</b>		850 - 2250	500 - 1450	160 - 950	1.0 - 3.0	100 - 500	60 - 450
		62 - 81%	32 - 59%	15 - 36%		8.0 - 20.0%	4.0 - 22.0%

IQR: Interquartile range



## CAPÍTULO 2

---

*Cellular and humoral immune responses and breakthrough  
infections after three SARS-CoV-2 mRNA vaccine doses*

Patricia Almendro-Vázquez, Marta Chivite-Lacaba, Alberto Utrero-Rico, Cecilia González-Cuadrado, Rocío Laguna-Goya, Miguel Moreno-Batanero, Laura Sánchez-Paz, Joanna Luczkowiak, Nuria Labiod, María Dolores Folgueira, Rafael Delgado, Estela Paz-Artal.

*Front Immunol.* 2022 Aug 17;13:981350. doi: 10.3389/fimmu.2022.981350.



## INTRODUCCIÓN

---

La vacunación contra el SARS-CoV-2 demostró ser la medida más eficaz para controlar la pandemia COVID-19. Desde que se iniciaron los protocolos de vacunación masiva en diciembre de 2020 se informó de la potente respuesta humoral inducida por las vacunas de ARNm, así como de la caída progresiva en los títulos de anticuerpos a partir del tercer mes tras la vacunación. Aunque los estudios previos destacaban también el papel de las células T específicas en el control de la infección natural, la información sobre la magnitud y durabilidad de la inmunidad celular inducida por las vacunas era muy escasa, lo que podía sugerir que evaluar únicamente la inmunidad humoral podría subestimar la protección real frente a la COVID-19. De igual forma, el efecto de las vacunas en individuos recuperados de COVID-19 y su comparación con el desarrollo de inmunidad en individuos sin exposición previa al SARS-CoV-2 (*naïve*) no estaba bien caracterizado.

Paralelamente, aunque la eficacia de las vacunas en la prevención de ingresos hospitalarios y muertes se mantuvo, se observó un aumento en las tasas de infección, probablemente debido a la combinación de la aparición de sucesivas VoC y un panorama de inmunidad humoral decreciente. En este contexto, se promovió la implementación de estrategias de refuerzo con una tercera dosis de vacuna en varios países. Estos *boost* comenzaron a administrarse con conocimiento limitado sobre su necesidad y efecto en la inmunidad humoral y celular preexistente.

## OBJETIVOS

---

En estas circunstancias, nos propusimos evaluar la respuesta inmunitaria adaptativa inducida por dos y tres dosis de vacunas de ARNm, en sujetos *naïve* y con infección previa por SARS-CoV-2, así como explorar posibles correlatos de protección frente a las infecciones de brecha. Los objetivos planteados fueron:

1. Caracterizar longitudinalmente la respuesta de células T, anticuerpos de tipo IgG y neutralizantes inducidos por la vacunación BNT162b2 de dos dosis.
2. Comparar la dinámica de las respuestas vacunales entre sujetos *naïve* para SARS-CoV-2 y sujetos con COVID-19 previa a la vacunación.

3. Evaluar el efecto de la tercera dosis de refuerzo (con la vacuna mRNA-1273) en la inmunidad adaptativa preexistente.
4. Identificar factores asociados a la protección contra la infección de brecha tras la vacunación contra el SARS-CoV-2.

## CONCLUSIONES

---

1. La respuesta máxima de células T e IgG inducida por dos dosis de BNT162b2 es similar en individuos *naïve* y recuperados de COVID-19 y se alcanza a los 15 días tras la segunda dosis. Sin embargo, la neutralización adquirida por los sujetos *naïve* es significativamente menor.
2. En ambas cohortes, la respuesta celular se mantiene estable entre los 3 y 6 meses posteriores a la segunda dosis, mientras que la respuesta humoral (anticuerpos de tipo IgG y con actividad neutralizante) disminuye significativa y progresivamente.
3. Durante los 6 meses posteriores a la segunda dosis de BNT162b2, la respuesta adaptativa se mantiene significativamente más alta en los individuos recuperados de COVID-19 en comparación con los sujetos *naïve*. Este mayor descenso de células T, IgG y neutralizantes tras la vacunación de dos dosis en los individuos *naïve* se asocia a mayor riesgo de infección en comparación con los sujetos vacunados que ya pasaron la infección natural.
4. El refuerzo de la inmunidad adaptativa provocado por la vacunación en sujetos con COVID-19 previa confiere una protección extra, incluso frente a la variante Ómicron, por lo que las dosis de refuerzo podrían espaciarse en estos sujetos.
5. Los individuos *naïve* son el grupo que más se beneficia de la administración de una tercera dosis de refuerzo debido al marcado aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes.
6. El desarrollo de una robusta respuesta de células T y anticuerpos neutralizantes a los 15 días tras la segunda dosis se asocia con protección frente a la infección. Por tanto, este perfil podría tenerse en cuenta para personalizar próximas estrategias de vacunación.

7. La exposición al SARS-CoV-2 potencia la inmunidad provocada por la vacunación, tanto si la infección es anterior como posterior a la misma.
8. En sujetos con infección previa por SARS-CoV-2 se detectan células T de memoria específicas del virus hasta 22 meses después de la infección.



# CAPÍTULO 2

---

**PUBLICACIÓN**

---





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Venkatesh Kumaresan,  
University of Texas at San Antonio,  
United States

## REVIEWED BY

Namdev Shivaji Togre,  
The University of Texas at El Paso,  
United States  
Fulvia Vascotto,  
Translationale Onkologie an der  
Universitätsmedizin der Johannes  
Gutenberg-Universität  
Mainz, Germany

## \*CORRESPONDENCE

Patricia Almendro-Vázquez  
patricia.almendro.vazquez@gmail.com

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 29 June 2022

ACCEPTED 29 July 2022

PUBLISHED 17 August 2022

## CITATION

Almendro-Vázquez P,  
Chivite-Lacaba M, Utrero-Rico A,  
González-Cuadrado C,  
Laguna-Goya R, Moreno-Batanero M,  
Sánchez-Paz L, Luczkowiak J,  
Labiód N, Folgueira MD, Delgado R  
and Paz-Artal E (2022) Cellular and  
humoral immune responses and  
breakthrough infections after three  
SARS-CoV-2 mRNA vaccine doses.  
*Front. Immunol.* 13:981350.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.981350

## COPYRIGHT

© 2022 Almendro-Vázquez, Chivite-Lacaba, Utrero-Rico, González-Cuadrado, Laguna-Goya, Moreno-Batanero, Sánchez-Paz, Luczkowiak, Labiód, Folgueira, Delgado and Paz-Artal. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Cellular and humoral immune responses and breakthrough infections after three SARS-CoV-2 mRNA vaccine doses

Patricia Almendro-Vázquez <sup>1\*</sup>, Marta Chivite-Lacaba <sup>1</sup>, Alberto Utrero-Rico <sup>1</sup>, Cecilia González-Cuadrado <sup>1</sup>, Rocio Laguna-Goya <sup>1,2,3</sup>, Miguel Moreno-Batanero<sup>1</sup>, Laura Sánchez-Paz<sup>1</sup>, Joanna Luczkowiak <sup>1</sup>, Nuria Labiód <sup>1</sup>, María Dolores Folgueira <sup>1,4</sup>, Rafael Delgado <sup>1,3,4,5</sup> and Estela Paz-Artal <sup>1,2,3,6</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain, <sup>2</sup>Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC – Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain, <sup>4</sup>Department of Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Department of Medicine, Medical School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, <sup>6</sup>Department of Immunology, Ophthalmology and ENT, Medical School, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

**Background:** SARS-CoV-2 vaccination has proven the most effective measure to control the COVID-19 pandemic. Booster doses are being administered with limited knowledge on their need and effect on immunity.

**Objective:** To determine the duration of specific T cells, antibodies and neutralization after 2-dose vaccination, to assess the effect of a third dose on adaptive immunity and to explore correlates of protection against breakthrough infection.

**Methods:** 12-month longitudinal assessment of SARS-CoV-2-specific T cells, IgG and neutralizing antibodies triggered by 2 BNT162b2 doses followed by a third mRNA-1273 dose in a cohort of 77 healthcare workers: 17 with SARS-CoV-2 infection prior to vaccination (recovered) and 60 naïve.

**Results:** Peak levels of cellular and humoral response were achieved 2 weeks after the second dose. Antibodies declined thereafter while T cells reached a plateau 3 months after vaccination. The decline in neutralization was specially marked in naïve individuals and it was this group who benefited most from the third dose, which resulted in a 20.9-fold increase in neutralization. Overall, recovered individuals maintained higher levels of T cells, antibodies and neutralization 1 to 6 months post-vaccination than naïve. Seventeen asymptomatic or mild SARS-CoV-2 breakthrough infections were reported

during follow-up, only in naïve individuals. This viral exposure boosted adaptive immunity. High peak levels of T cells and neutralizing antibodies 15 days post-vaccination associated with protection from breakthrough infections.

**Conclusion:** Booster vaccination in naïve individuals and the inclusion of viral antigens other than spike in future vaccine formulations could be useful strategies to prevent SARS-CoV-2 breakthrough infections.

#### KEYWORDS

SARS-CoV-2, COVID-19, vaccination, third dose, immune response, breakthrough infection, hybrid immunity

## Introduction

Vaccination against SARS-CoV-2 has been revealed as the most effective measure to control the COVID-19 pandemic preventing infection and especially severe disease (1). The 2-dose mRNA vaccines BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) and mRNA-1273 (Moderna) encoding a stabilized version of the full-length spike protein have been broadly administered after showing safety and a 95% efficacy in preventing symptomatic disease in clinical trials (2, 3). These mRNA vaccines elicit an early and potent humoral immune response (4–6), that begins to decline after 1 month post-vaccination (7, 8). However, circulating antibodies persist for at least 6 months (8–10) and their neutralizing activity has been detected up to 8 months after vaccination (11). Moreover, the efficacy of the vaccine in preventing hospital admissions and deaths is maintained beyond six months post-vaccination (12, 13). Yet, some studies report that decreased antibody levels may be associated with an increased rate of infections (14, 15).

Immunological studies of SARS-CoV-2 infection highlight the role of specific T cells in disease control (16–18) and support that only measuring specific IgG may underestimate protection against COVID-19 (19, 20). mRNA vaccination has also been shown to develop spike-specific T cells (5, 19, 21, 22) that can contribute to protection upon exposure to the virus. Nevertheless, the durability and magnitude of memory T cells after vaccination remains poorly understood since only a handful of studies have studied the maintenance of T cell response up to six months post-vaccination (4, 23–25).

The emergence of several SARS-CoV-2 variants and the increased transmission have promoted the application of third

vaccine booster dose strategies in different countries. However, information on how preexisting SARS-CoV-2 humoral and cellular immunity are boosted by a third mRNA vaccination remains limited. Recent studies have shown improved effectiveness of a third dose in preventing SARS-CoV-2 infection and severe illness (26–28) and an increase in antibodies levels (29, 30) and neutralization efficiency (31). Yet, data on the real-world T cell immunity dynamic after third doses of COVID-19 mRNA vaccine are still very scarce (32–34).

Here we show the first longitudinal analysis including the cellular, IgG and neutralizing antibody responses elicited by the 2-dose BNT162b2 vaccination plus a third mRNA-1273 boost dose in 77 healthcare workers, 17 of whom had suffered SARS-CoV-2 infection prior to the first vaccine dose. SARS-CoV-2-specific T cells remained stable 3 to 6 months after 2-dose mRNA vaccination, whereas antibodies and their neutralizing activity gradually declined. We also describe that SARS-CoV-2 recovered individuals maintained higher levels of specific T cells and total and neutralizing antibodies than naïve individuals. In addition, administration of the third vaccine dose boosted cell- and antibody-mediated immunity, especially T cells in recovered subjects and neutralizing antibodies in naïve subjects. Finally, we describe the association between high peak levels of T cells and neutralizing antibodies post-vaccination and protection from breakthrough infections. These analyses provide insights into mRNA vaccine-induced immunogenicity and may be relevant for future vaccine strategies, including recommendations and target populations for booster doses.

## Materials and methods

### Study design and sample collection

Seventy-seven healthcare workers undergoing COVID-19 vaccination were recruited at Hospital Universitario 12 de

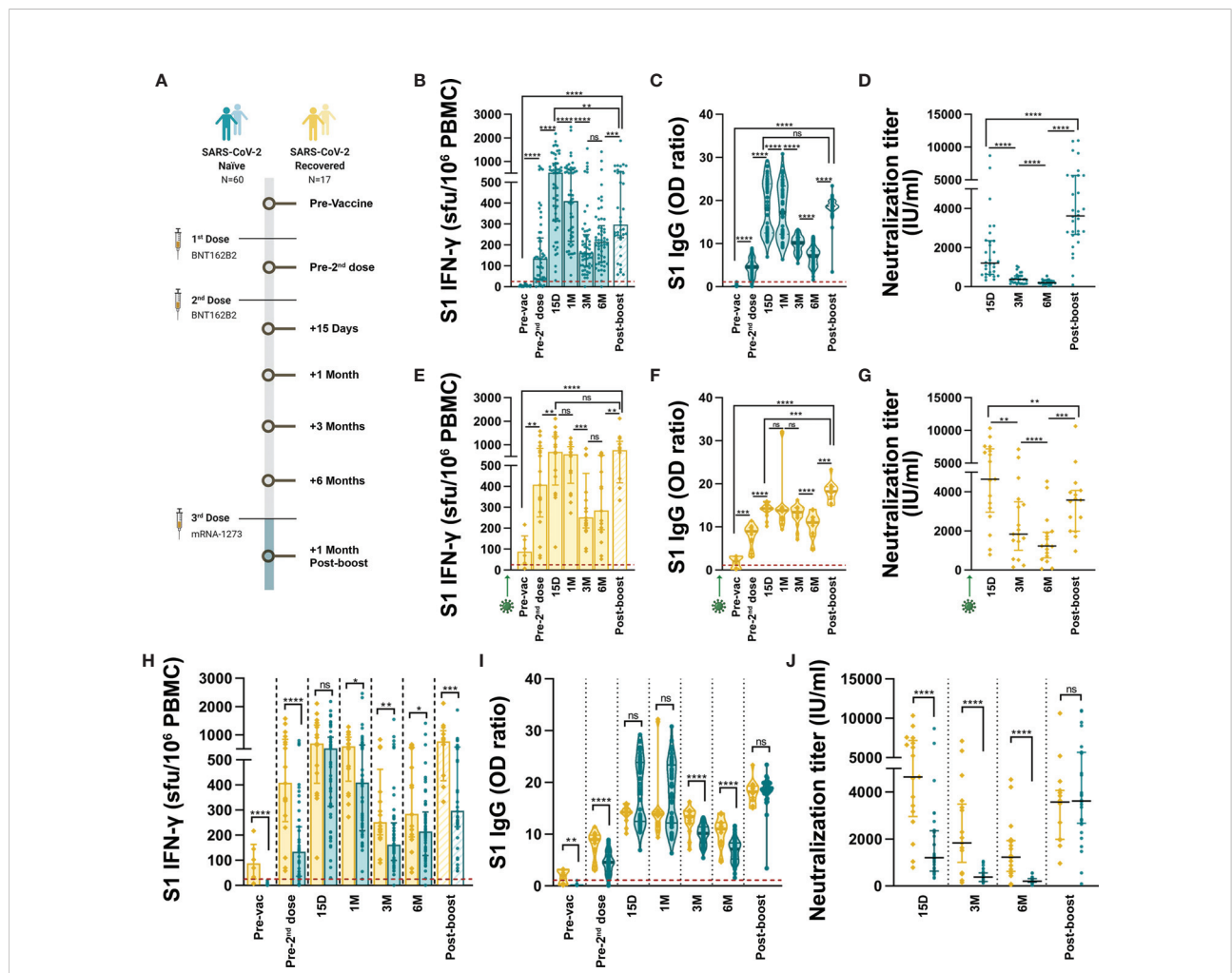
**Abbreviations:** COVID-19, Coronavirus disease 2019; EMPS, Epitope Mapping Peptide Set; IFN- $\gamma$  Interferon- $\gamma$ ; IL-2, Interleukin-2; IU/ml, International Units per ml; IQR, Interquartile range; M, Membrane; NT50, Neutralizing titer 50; N, Nucleocapsid; NA, Not assessed; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; RSV, Relative spot volume; SARS-CoV-2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Sfu, Spot forming units.

Octubre (Madrid, Spain). Participants received the two 30 µg dose, 21 days apart, BNT162b2 vaccination schedule in early 2021, and after 10 months they received the 50-µg mRNA-1273 boost, in December 2021. Samples were longitudinally collected at 7 time points: pre-vaccine baseline, 21 days after the first BNT162b2-dose, 15 days, 1, 3 and 6 months after the second BNT162b2-dose and 30 days after mRNA-1273 third boost dose. The subjects were further stratified on the basis of SARS-CoV-2 infection prior to vaccination confirmed by either positive RT-PCR or S1 domain of the Spike glycoprotein (S1), Nucleocapsid (N) and/or Membrane (M) SARS-CoV-2-specific T cells above

the positivity threshold by fluorospot (60 SARS-CoV-2-naïve; 17 SARS-CoV-2-recovered) (Figure 1A). Vaccination side effects after the three vaccine doses were collected using a standardized questionnaire. The Institutional Review Board approved the study (21/039 and 21/056).

### FluoroSpot assay

Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were seeded in duplicate at 300,000 cells/well in



**FIGURE 1** Development and maintenance of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after 3 mRNA vaccine doses. (A) Study design and cohorts, samples were collected pre-vaccine, 21 days after the first dose, 15, 30, 90 and 180 days after the second dose and 30 days after third boost dose. (B) Dynamics of vaccine-triggered S1-IFN-γ-producing T cell response in SARS-CoV-2 naïve individuals (in blue). Data is represented as spot forming unit (sfu) per million PBMC. Dashed lines represent the positivity cut-off established by using a non-infected control group: >25 sfu/10<sup>6</sup> PBMC. (C) anti-S1 IgG levels elicited by mRNA vaccination in SARS-CoV-2 naïve individuals. Dashed line represents the established cut-off of positivity: OD ratio ≥1.1. (D) Vaccine-triggered neutralizing activity in SARS-CoV-2-naïve serum samples, represented as International Units per ml (IU/ml). (E–G) Dynamics of S1-IFN-γ-producing T cell (E), anti-S1 IgG (F) and neutralizing antibody (G) responses elicited by mRNA vaccination in SARS-CoV-2 recovered individuals (in yellow). (H–J) Comparison of S1 T cell (H), anti-S1 IgG (I) and neutralizing (J) responses between SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals. Green arrows represent the time of SARS-CoV-2 infection. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests; ns: not statistically significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

IFN- $\gamma$  IL-2 FluoroSpot™ plates (MabTech). Cells were supplemented with 15-mer overlapping peptides covering the S1 domain of the Spike glycoprotein (SARS-CoV-2 S1 scanning pool, MabTech), the Nucleocapsid protein (Epitope Mapping Peptide Set [EMPS] SARS-CoV-2 NCAP-1, JPT), and the Membrane protein (EMPS SARS-CoV-2 VME1, JPT) at a final concentration of 1  $\mu$ g/mL. Assays were incubated for 16–18 hours at 37°C. Spots were counted using automated IRIS™ FluoroSpot Reader System (MabTech). Results were expressed as IFN- $\gamma$ - or IL-2-producing spot forming units (sfu) per 10<sup>6</sup> PBMCs. Responses were considered positive if the results were at least three times higher than the mean of the negative control and >25 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMCs for S1, >14 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMCs for N, and >21 IFN- $\gamma$  sfu/10<sup>6</sup> PBMCs for M proteins, as previously published (19, 35). Apart from the sfu, which correspond to the frequency of antigen-specific T cell clones, the relative spot volume (RSV), which represented the amount of secreted IFN- $\gamma$  per spot, was also obtained.

## Anti-S1 IgG detection by ELISA

Serum SARS-CoV-2 IgG antibodies targeting the S1 protein were detected with the Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA (Euroimmun AG, Lübeck, Germany) according to manufacturer's instructions. Results were evaluated semi-quantitatively by calculating the ratio of the OD value of the sample over the OD value of the calibrator (relative OD), with the following cut-off values: OD ratio <1.1: negative; and OD\_ratio  $\geq$ 1.1: positive.

## SARS-CoV-2 neutralization assay

SARS-CoV-2-pseudotyped rVSV-luc were produced as previously published (11, 36, 37). Serum samples were tested at dilutions 1:80, 240, 720, 2160, 6480. SARS-CoV-2-pseudotyped rVSV-luc was normalized for infectivity to a MOI of 0.5 and incubated with the serum samples at 37°C for 1 h. Next, Vero E6 cells were seeded onto the virus-serum mixture and incubated at 37°C for 24h. Cells were then lysed and assayed for luciferase expression. Neutralizing titer 50 (NT50) was calculated using a nonlinear regression model fit with settings for log agonist versus normalized response curve. Neutralization potency of serum samples were calibrated using the WHO International Standard 20/136, which was assigned 813 International Units per ml [IU/ml]. Calibrated NT50 in IU/ml for each serum sample was calculated as the observed NT50 titers multiplied by the calibration factor (assigned as 0.756), which is estimated as 813 IU/ml divided by NT50 (tested as 1:1075) of the 20/136 standard (11, 36). The cut-off titer for neutralization positivity was 45 IU/ml (38).

## Statistical analysis

Quantitative data were shown as the median with IQR, and qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Non-parametric Mann-Whitney U or Wilcoxon signed-rank tests were applied for comparison within two groups, when necessary. Kruskal-Wallis test was used to compare three or more unmatched groups. Correlations between continuous variables were evaluated using Spearman's rank test. Grouping of individuals was done according to mean SFU and neutralization titer. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software Inc, LaJolla, CA) and R software v4.1.1.

## Results

### Cohort design and participants

Cellular and humoral SARS-CoV-2-specific immune responses were prospectively analysed in 77 healthcare workers undergoing vaccination, comprising a total of 539 longitudinal samples studied (Figure 1A). The median age of the cohort was 39 years old (interquartile range [IQR] 22–64 years) and 57/77 (74%) participants were females, with no relevant comorbidities. Based on SARS-CoV-2 infection prior to vaccination, the cohort included 60 SARS-CoV-2 naïve and 17 recovered individuals. All recovered subjects had been infected by the ancestral Wuhan SARS-CoV-2 strain during the first pandemic wave in Spain. They had been either asymptomatic or suffered mild COVID-19 (WHO ordinal scale of 0–2). The median time from symptom onset to administration of the first BNT162b2-dose was 285 days ([IQR] 272–298 days). There were no differences in sex or age between naïve and recovered individuals. Vaccination side effects were more frequent among subjects with prior SARS-CoV-2 infection compared to naïve subjects (Figure S1), and increased their frequency with subsequent vaccine doses (median [IQR] number of side effects after the first, second and third doses were 2 [2–3], 4 [2–6] and 5 [3–7], respectively).

### Vaccine-triggered adaptive immune response dynamics

We studied the development and maintenance of SARS-CoV-2-specific T cells, IgG, and neutralizing antibodies after vaccination in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals. Among naïve subjects, the peak S1-specific cellular response was achieved 15 days after the second vaccine dose, then it decreased

steadily and finally reached a plateau at month 3, remaining stable up to month 6 post-vaccination (Figure 1B). All vaccinees except one remained above the positivity threshold for cellular response during this period. The administration of the third booster dose significantly increased the number of S1-specific T cells compared to 6 months post-vaccination (Figure 1B), although, the magnitude of this response did not reach peak levels. Regarding the humoral response, peak levels of S1-specific IgG antibodies were also detected 15 days after the second dose, and then they gradually declined over the next 6 months although remained detectable in all subjects (Figure 1C). The third vaccine dose boosted anti-S1 IgG to levels comparable to the peak response (Figure 1C). Similarly, the maximum neutralizing response against SARS-CoV-2 elicited by 2 vaccine doses was observed 15 days after the second dose and it experienced a remarkable reduction over the course of the next 6 months (Figure 1D). All vaccinees except one remained positive for neutralization, although the levels of neutralization 6 months after the second dose were only slightly above the 45 IU/ml positivity threshold. Among naïve individuals the third vaccine dose elicited the highest levels of neutralizing antibodies, with a 20.9-fold increase compared to the previous measurement (Figure 1D). Anti-S1 IgG positively correlated with the neutralizing activity of serum samples at all time points (Figure S2). The development of IL-2-producing and IFN- $\gamma$ +IL-2 double positive S1-specific T cells followed a dynamic similar to that of IFN- $\gamma$ -producing T cells (Figures S3A, B), although 3 and 6 months after the second dose the number of IL-2-producing clones significantly exceeded that of IFN- $\gamma$  (Figure S3C).

Similar to naïve individuals, in SARS-CoV-2 recovered subjects the maximum cellular response to vaccination was reached 2 weeks after the second dose, it declined up to month 3 and then remained stable up to month 6 (Figures 1E, S3D, E). During this period, there were more IFN- $\gamma$ -producing T cells than IL-2 (Figure S3F). The third vaccine dose significantly enhanced the S1-specific T cell response which reached peak levels (Figure 1E). Similarly, anti-S1 IgG levels reached their peak 2 weeks after the second dose and then experienced a progressive decline up to month 6, although all subjects remained S1-IgG-positive (Figure 1F). After the third dose the anti-S1 IgG antibodies were the highest. The neutralizing activity followed a similar profile to that of total antibodies, and despite the decline over time, neutralizing antibodies remained well above the positivity threshold 6 months after vaccination (Figure 1G). The third vaccine administration boosted the neutralizing activity with a 2.3-fold increase, which nevertheless did not reach the maximal level observed 15 days post-second dose. As in naïve individuals, anti-S1 IgG positively correlated with the neutralizing activity of serum samples at all time points (Figure S2).

## Distinct patterns and maintenance of response in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals

mRNA vaccines induced robust circulating cellular and antibody responses specific to the S1 SARS-CoV-2 protein. However, these responses showed different dynamics depending on whether or not individuals had COVID-19 prior to vaccination. Although the peak T cell response elicited 2 weeks after the second dose was similar in both groups (Figures 1H, S3G, H), the maintenance of IFN- $\gamma$ -producing T cell responses thereafter was significantly higher in SARS-CoV-2 recovered than in naïve individuals, both the number of specific T cells and the amount of IFN- $\gamma$  released by each T cell clone (Figures 1H, S3I). After the third dose, the T cell response developed in subjects with prior COVID-19 was significantly higher both in the number of S1-specific clones (Figure 1H) and in the amount of IFN- $\gamma$  secreted per clone (Figure S3I) compared to naïve individuals.

Humoral response paralleled T cell behaviour, since anti-S1 IgG peak levels were similar at 2 weeks post-second vaccine dose but the decline in antibody levels was significantly lower in SARS-CoV-2 recovered compared to naïve individuals over the course of the next 6 months (Figure 1I). The administration of the third vaccine dose elicited similar anti-S1 IgG levels in both groups (Figure 1I). Two-dose vaccination in SARS-CoV-2 recovered individuals induced a much higher level of neutralizing antibodies as compared with naïve individuals up to 6 months post-vaccination (Figure 1J). Three vaccine doses were required to develop a similar neutralizing activity in both cohorts (Figure 1J). The boost in neutralizing capacity triggered by the third dose was much higher in naïve than in recovered individuals (20.9- versus 2.3-fold increase).

We found no association between age and strength of the cellular or humoral immune response as measured at month 6 after 2-dose vaccination, either in SARS-CoV-2 naïve or recovered individuals (Figures S4A–C). Finally, significant positive correlations between the number of side effects and the magnitude of both T cell and antibody responses were exclusively found in SARS-CoV-2 naïve individuals after the second vaccine dose (Figures S4D–I).

## Breakthrough SARS-CoV-2 infections after mRNA vaccination

Five naïve individuals had a SARS-CoV-2 infection 3 to 6 months after completing the standard 2-dose vaccination and another 12 naïve subjects suffered a breakthrough infection approximately 1 month after the boost, coinciding with the Omicron pandemic wave (Figure 2A). All breakthrough infections in naïve individuals ranged from asymptomatic to

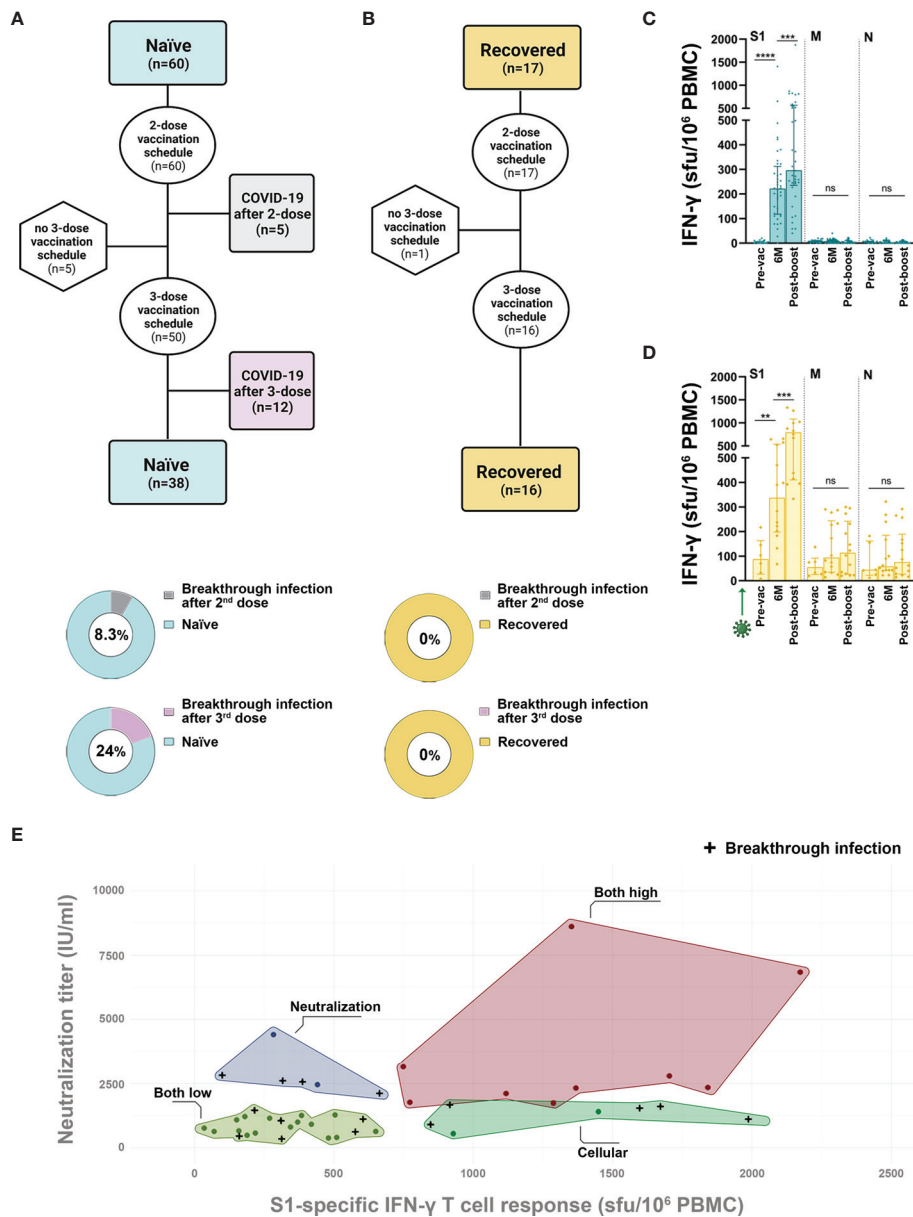


FIGURE 2

Factors associated with protection against breakthrough infection after SARS-CoV-2 vaccination. (A, B) Flowchart of SARS-CoV-2 naïve (A) and recovered (B) individuals included in the study and the frequency of SARS-CoV-2 infection reported after the second or third vaccine dose. (C, D) SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$ -producing T cell responses reactive to the S1, M and N proteins in subjects who remained SARS-CoV-2 naïve during follow-up (C) and in recovered (D) individuals. (E) Clustering based on S1-IFN- $\gamma$ -producing T cell average and neutralizing titer average 15 days after the second BNT162b2 dose, when the vaccine-elicited immune response peaked, in naïve individuals. Green arrows represent the time of SARS-CoV-2 infection. Black crosses represent SARS-CoV-2-infected subjects after mRNA vaccination. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests, ns: not statistically significant, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

mild COVID-19 (WHO ordinal scale of 0-2). In contrast, no breakthrough infection was recorded in the COVID-19 recovered individuals, neither after the second or the third dose (Figure 2B). As expected, none of the individuals who remained naïve developed M- or N-specific T cells during

follow-up (Figure 2C), while the absence of breakthrough infections in recovered individuals could be confirmed by the lack of any boost in the specific T cell response against M or N proteins (Figure 2D). Of note, all SARS-CoV-2 recovered individuals maintained cellular response against M and/or N

above the positivity threshold during follow-up (Figure 2D), which meant recovered subjects exhibited detectable virus-specific memory T cells up to 22 months after infection, coinciding with the post-boost sample. Recovered subjects were protected against breakthrough infection compared to naïve (0/17 versus 17/60, Fisher's test,  $p=0.017$ ). Demographic and immunological characteristics of subjects infected after vaccination are shown in Table 1. None of the analysed immune parameters were consistently low in infected compared to uninfected individuals. Interestingly, a cluster analysis in naïve individuals based on the mean peak cellular and neutralizing response after vaccination showed that subjects who developed both high T cell ( $>700$  S1 IFN- $\gamma$  sfu/ $10^6$  PBMCs) and neutralizing ( $>1/1206$  IU/ml) response, were protected against breakthrough infection (Figure 2E). These analyses suggest that individuals with a lower-than-average cellular or neutralizing response may benefit from the administration of a third booster dose.

Finally, regarding the effect of breakthrough infections on immunity, SARS-CoV-2 infections after the second or the third vaccine dose increased the S1-specific T cell response compared to individuals who remained naïve throughout the study (Figures 3A–C, S5A–D), and, as expected, also induced the development of IFN- $\gamma$  T cells against SARS-CoV-2 M and N

proteins (Figures S5E, F). Both total (Figures 3D–F) and neutralizing (Figures 3G–I) antibodies were also boosted after exposure to the virus.

## Discussion

There is currently the need to better understand the longevity of specific immune responses after SARS-CoV-2 infection and/or vaccination and to characterize the effect of booster doses on immunity in order to take informed decisions on the adequacy, and optimal interval, of successive vaccine doses. Our longitudinal analysis of cellular and humoral SARS-CoV-2-specific immunity elicited by mRNA vaccination showed the different dynamic and maintenance of virus-specific memory depending on whether or not a SARS-CoV-2 infection has been passed prior to vaccination. In addition, we describe in real-world conditions how a third mRNA vaccine dose not only boosted pre-existing SARS-CoV-2 humoral but also cellular immunity.

Similarly to previous reports we found robust antigen-specific cellular and humoral responses after 2-dose BNT162b2 vaccination schedule (5, 17, 39), which relates with a high effectiveness in preventing SARS-CoV-2 infection in the real

TABLE 1 Characteristics of SARS-CoV-2 infected individuals after mRNA vaccination.

Subject	Sex <sup>a</sup>	Age (years)	Time from last dose to infection	Peak T cell <sup>b</sup> (sfu/ $10^6$ PBMCs)	T cell prior to infection <sup>c</sup> (sfu/ $10^6$ PBMCs)	Peak IgG <sup>b</sup> (OD ratio)	IgG prior to infection <sup>c</sup> (OD ratio)	Peak Nabs <sup>b</sup> (IU/ml)	Nabs prior to infection <sup>c</sup> (IU/ml)
1	F	39	96 days	158	NA	10.1	NA	470	NA
2	F	25	154 days	1598	237	25.6	11.0	1543	338
3	M	22	163 days	1987	730	19.8	8.7	1111	297
4	F	51	170 days	577	60	9.4	6.2	612	109
5	F	41	178 days	308	280	12.6	9.7	1075	340
6	F	52	17 days	387	225	18.0	7.8	2580	244
7	F	33	18 days	663	88	28.2	8.2	2120	178
8	F	37	18 days	610	223	21.9	3.25	NA	NA
9	F	61	19 days	847	413	18.9	7.1	924	269
10	F	37	20 days	605	170	22.1	8.2	1111	222
11	M	30	21 days	119	108	27.9	10.3	2835	297
12	F	56	26 days	548	153	12.2	6.83	NA	NA
13	F	45	28 days	313	203	10.7	5.3	358	169
14	F	34	29 days	658	197	22.6	4.6	2611	178
15	M	44	31 days	915	297	23.9	8.9	1659	271
16	F	25	32 days	1672	1017	24.1	8.1	1622	362
17	F	43	34 days	213	43	20.8	8.4	1467	410
Mean Breakthrough Infection				716	277	19.3	7.7	1473	263
Mean Naïve During Follow-up				711	258	17.0	7.1	1206	206
Mean Naïve Cohort				700	256	18.0	7.0	1206	206

<sup>a</sup>F, Female; M, Male.

<sup>b</sup>Peak response was achieved 15 days after the second BNT162b2 dose.

<sup>c</sup>Subjects 1-5 were infected after the 2<sup>nd</sup> dose, their timepoint prior to infection was 3 months. Subjects 6-17 were infected after the 3<sup>rd</sup> dose, their timepoint prior to infection was 6 months.

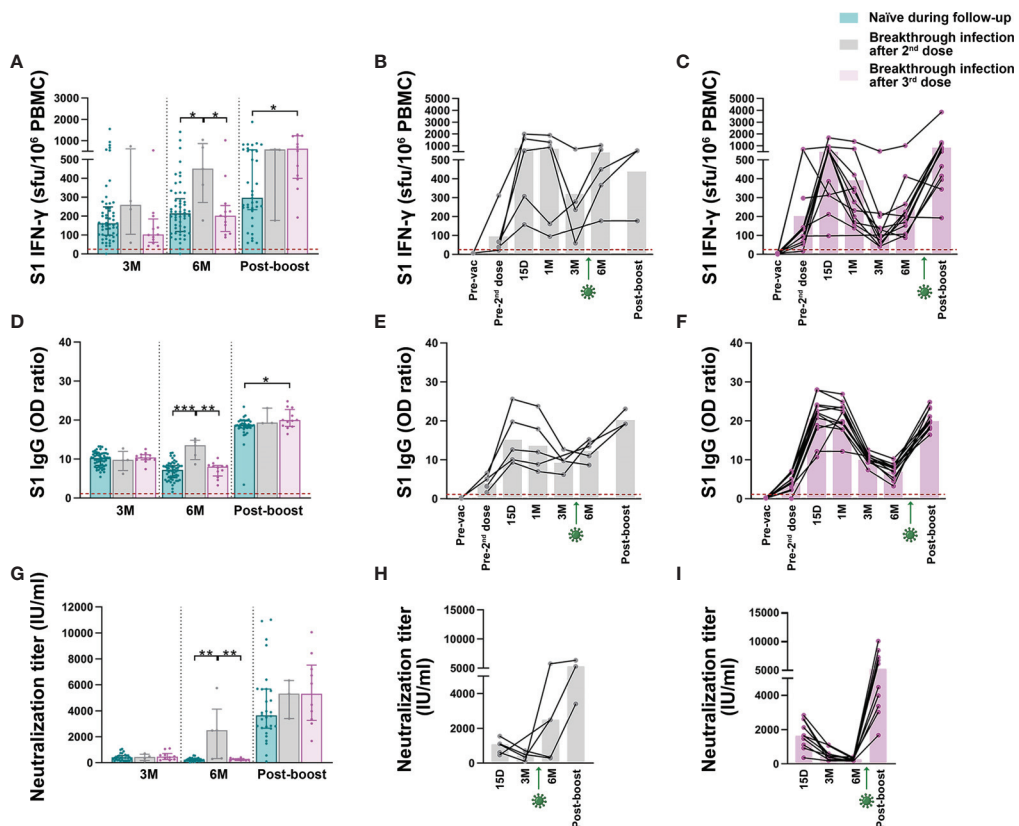


FIGURE 3

Effect of breakthrough infections on existing SARS-CoV-2 immunity. (A) Comparison of S1-IFN- $\gamma$ -producing T cells among naive individuals who remain naive (in blue) and those with breakthrough infections after 2<sup>nd</sup> (in grey) and 3<sup>rd</sup> dose (in purple). Out of the 5 subjects who had SARS-CoV-2 infection after the 2<sup>nd</sup> dose only 3 subjects received the third vaccine dose. (B, C) Longitudinal data on the dynamics of specific T cells in the 5 subjects infected by SARS-CoV-2 after the 2<sup>nd</sup> dose (B) and in the 12 individuals infected after the 3<sup>rd</sup> dose (C). (D) Comparison of anti-S1IgG levels among SARS-CoV-2 naive individuals and breakthrough infections after 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> dose. (E, F) Dynamics of antibody levels in subjects infected after the 2<sup>nd</sup> (E) and the 3<sup>rd</sup> dose (F). (G) Comparison of neutralizing activity among SARS-CoV-2 naive individuals and breakthrough infections after 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> dose. (H, I) Neutralizing activity in SARS-CoV-2 infected subjects after the 2<sup>nd</sup> (H) and the 3<sup>rd</sup> dose (I). Green arrows represent the time of SARS-CoV-2 infection. Dashed lines represent the positivity cut-off. The significance between groups was determined using Mann Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (See Figure 1 footnote for more detailed information).

world (1, 40, 41). However, a decrease in immunity was observed 1 month post-vaccination, and while T cells reached a plateau, antibodies continued to decline steadily. This waning immunity could cause, together with the emergence of viral variants, the observed decrease in vaccine effectiveness (13, 14, 41, 42). In our cohort there was a patient with a particularly poor cellular and humoral response to vaccination who was a 60-year-old man with a past history of alcohol abuse and currently in a good general condition under treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor, beta-blocker, disulfiram and gabapentin. This medical history could possibly explain his weak immune response; however, he remained naive during follow-up.

So far, most studies have focused on the magnitude of the spike-specific antibody response or neutralizing titer following

COVID-19 vaccination (4, 6, 8, 43–45). Our results showed that the number of S1-specific T cell clones remains stable from 3 to 6 months after the second BNT162b2 dose administration, confirming recent observations (7, 25). SARS-CoV-2 infection studies have demonstrated that T cell response is essential for viral clearance, may prevent infection without seroconversion, provides robust memory, and mediates recognition of viral variants (46). In our cohort, all individuals who had COVID-19 prior to vaccination maintained a cellular response against M and N above the positivity threshold 22 months post-symptom onset. This characterization of virus-specific T cell memory up to 22 months goes beyond previous studies that limited SARS-CoV-2-specific T cells determination up to 12 (47) and 15 months post-infection (48). In addition, to date, vaccine-

elicited T cell responses remain capable of recognizing all known SARS-CoV-2 variants (25, 49). Altogether these data suggest that SARS-CoV-2-specific T cells could provide long-term protection against severe COVID-19 and death.

The strength and maintenance of IFN- $\gamma$ -producing T cells and total and neutralizing antibodies from 1 to 6 months post-vaccination were significantly higher in SARS-CoV-2 recovered compared to naïve individuals. Recovered subjects present what is called “hybrid immunity”, which is developed by the combination of vaccination and natural infection, and results in more potent and long-lived immune response (50), partly due to a wider breadth for T cells and antibodies (51, 52). In fact, in our cohort none of the recovered subjects had a breakthrough infection during the 12-month follow up period. The protection shown by recovered subjects suggests that the design of vaccines that include antigens from viral proteins other than spike may complement and boost the immunity in already vaccinated population.

Administration of the third vaccine dose boosted humoral and cell-mediated immunity, which likely explains the findings that COVID-19 booster vaccination restores relative effectiveness to 90-95% against severe disease or death (27, 28, 53). The boost in T cells was more marked in recovered individuals, while the increase in humoral response, especially neutralizing antibodies, was remarkable in naïve subjects. The third dose produced a 20-fold increase in neutralization in naïve individuals and only then neutralizing antibodies titers were similar to those of recovered subjects. On the contrary, recovered individuals only had a modest antibody boost which suggests that pre-existing high levels of circulating antibodies may limit the effect of vaccine boosting (54). SARS-CoV-2 naïve individuals clearly benefited from the booster dose because it greatly enhanced their neutralizing capacity, while the benefit of booster vaccination in recovered individuals is questionable, as already indicated (55). These results may help to better identify target populations that could benefit most from booster doses and to design new fit vaccine strategies.

In our cohort, none of the analysed immune parameters, namely specific T cells, antibodies or neutralizing titers, associated individually with protection from breakthrough infection. It was the combination of a high cellular and neutralizing response after vaccination that protected against breakthrough infection in naïve individuals. Our previous work showed that the development of early and coordinated cellular and humoral responses upon SARS-CoV-2 infection led to a mild course of the disease (19). Patients who initially responded to infection by producing a large amount of antibodies tended to develop severe COVID-19. Similarly, the increased production of antibodies after vaccination observed in some naïve subjects did not associate with protection. These findings highlight the relevance of monitoring SARS-CoV-2-specific cellular immune responses,

and not only antibody levels, as a correlate for protection after infection and/or vaccination.

A limitation in the search for protection immune correlates is the lack of standardized assays, especially for the measuring of specific cellular responses and neutralizing activity. Mangia *et al.* recently suggested that simultaneous neutralizing antibody titers <1/20, binding antibody levels <200 BAU/ml and IFN- $\gamma$  <1,000 mIU/ml could identify subjects at risk of breakthrough infections (56). However, the definition of specific thresholds for risk or protection will not be useful until standardized assays to analyse specific T cell memory and neutralization are developed. In addition, the percentage of women is higher than that of men, which may be a limitation of the study. However, we found no association between sex and strength of the cellular or humoral immune response.

In summary, our work highlights that both specific T cells and neutralizing antibodies are important to prevent SARS-CoV-2 infection and to reduce severity in breakthrough infections. The third dose significantly increased cellular and humoral immunity against SARS-CoV-2, by enhancing neutralizing capacity especially in naïve individuals and specific T cells mainly in recovered subjects. In order to prevent future infections and severe cases of COVID-19, it would be advisable the administration of booster doses to all naïve individuals and the inclusion of viral antigens other than spike in new mRNA vaccine designs.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The Institutional Review Board approved the study (21/039 and 21/056). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

PA-V, RL-G, RD, and EP-A conceived and designed the study. PA-V, MC-L, CG-C, MM-B, LS-P, and RL-G recruited participants and collected clinical data. PA-V, MC-L, AU-R, CG-C, MM-B, LS-P, JL, and NL performed the experimental work. PA-V, MC-L, AU-R, JL, and MF performed the statistical analysis. PA-V, RL-G, and EP-A wrote the manuscript. All authors contributed to interpretation of the data. All authors revised the manuscript and approved the final version before submission.

## Funding

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation (COVID-19 research call COV20/00181) — co-financed by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”, Operative Program Intelligent Growth 2014-2020, and by Comunidad de Madrid (INMUNOVACTER REACT-UE) to EP-A. Instituto de Investigación Carlos III grant FIS PI2100989 and the European Commission Horizon Europe (project EPIC-CROWN-2 ref 101046084) to RD. RL-G holds a research contract “Rio Hortega” (CM19/00120) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation. MC-L holds a predoctoral fellowship (FPU19/06393) from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

## Acknowledgments

We would like to thank all participants, nurses and medical colleagues who contributed to the study.

## References

- Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner H, Yoon SK, Meece J, et al. Prevention and attenuation of covid-19 with the Bnt162b2 and mrna-1273 vaccines. *N Engl J Med* (2021) 385(4):320–9. doi: 10.1056/NEJMoa2107058
- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mrna-1273 sars-cov-2 vaccine. *N Engl J Med* (2021) 384(5):403–16. doi: 10.1056/NEJMoa2035389
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the Bnt162b2 mrna covid-19 vaccine. *N Engl J Med* (2020) 383(27):2603–15. doi: 10.1056/NEJMoa2034577
- Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory b cell responses in sars-cov-2 naive and recovered individuals following mrna vaccination. *Sci Immunol* (2021) 6(58). doi: 10.1126/sciimmunol.abi6950
- Kalimuddin S, Tham CYL, Qui M, de Alwis R, Sim JXY, Lim JME, et al. Early T cell and binding antibody responses are associated with covid-19 rna vaccine efficacy onset. *Med (N Y)* (2021) 2(6):682–8 e4. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.003
- Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finklin S, et al. Mrna vaccine-elicited antibodies to sars-cov-2 and circulating variants. *Nature* (2021) 592(7855):616–22. doi: 10.1038/s41586-021-03324-6
- Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, Rosenfeld AM, et al. Mrna vaccines induce durable immune memory to sars-cov-2 and variants of concern. *Science* (2021) 374(6572):abm0829. doi: 10.1126/science.abm0829
- Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning immune humoral response to Bnt162b2 covid-19 vaccine over 6 months. *N Engl J Med* (2021) 385(24):e84. doi: 10.1056/NEJMoa2114583
- Ciabattini A, Pastore G, Fiorino F, Polvere J, Lucchesi S, Pettini E, et al. Evidence of sars-cov-2-specific memory b cells six months after vaccination with the Bnt162b2 mrna vaccine. *Front Immunol* (2021) 12:740708. doi: 10.3389/fimmu.2021.740708
- Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O’Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody persistence through 6 months after the second dose of mrna-1273

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

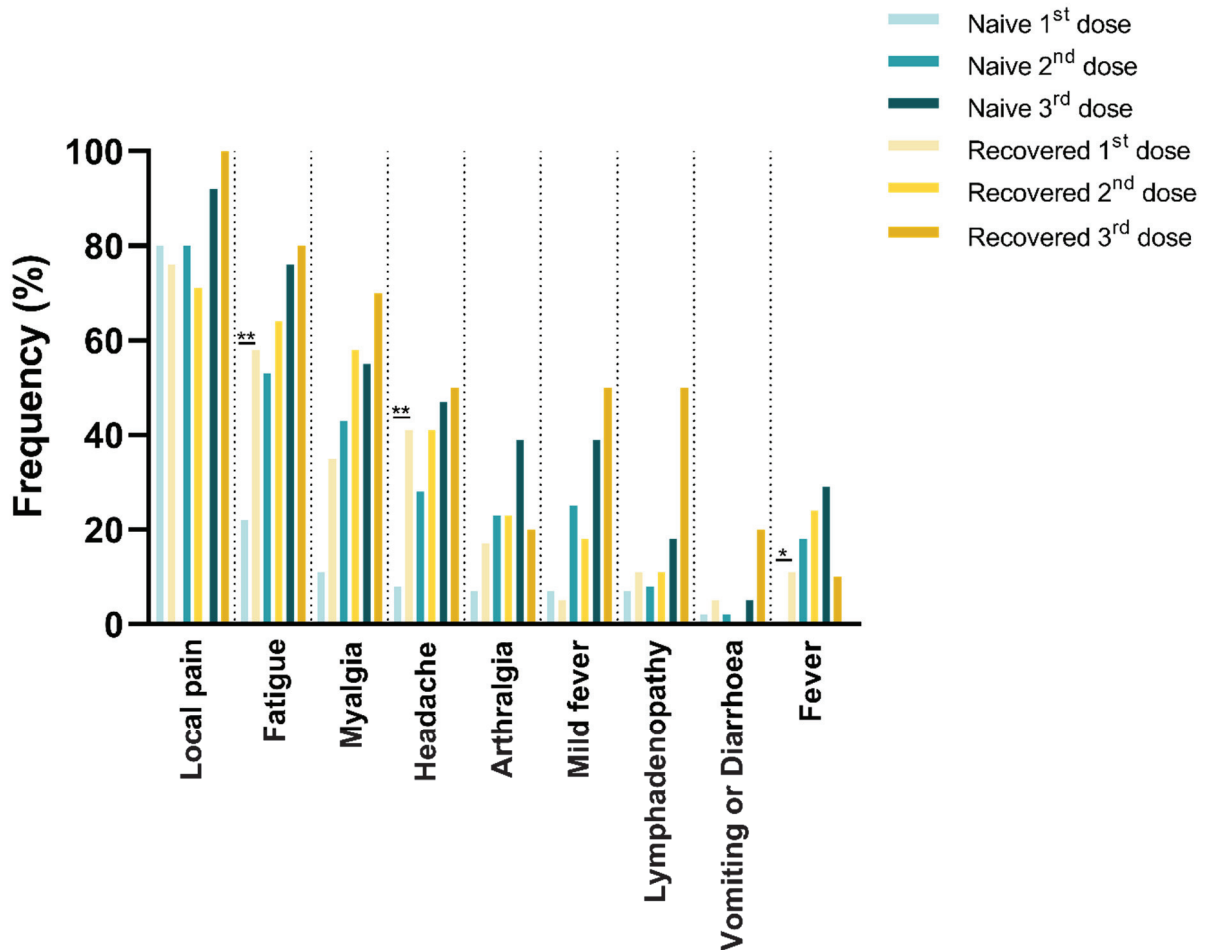
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.981350/full#supplementary-material>

- Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner H, Yoon SK, Meece J, et al. Prevention and attenuation of covid-19 with the Bnt162b2 and mrna-1273 vaccines. *N Engl J Med* (2021) 384(23):2259–61. doi: 10.1056/NEJMoa2103916
- Luczkowiak J, Labiod N, Rivas G, Rolo M, Lasala F, Lora-Tamayo J, et al. Neutralizing response against sars-cov-2 variants 8 months after Bnt162b2 vaccination in naive and covid-19-convalescent individuals. *J Infect Dis* (2022) 225(11):1905–8. doi: 10.1093/infdis/jiab634
- Griffin JB, Haddix M, Danza P, Fisher R, Koo TH, Traub E, et al. Sars-cov-2 infections and hospitalizations among persons aged  $\geq 16$  years, by vaccination status - Los Angeles county, California, may 1-July 25, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2021) 70(34):1170–6. doi: 10.15585/mmwr.mm7034e5
- Tartof SY, Slezak JM, Fischer H, Hong V, Ackerson BK, Ranasinghe ON, et al. Effectiveness of mrna Bnt162b2 covid-19 vaccine up to 6 months in a large integrated health system in the USA: A retrospective cohort study. *Lancet* (2021) 398(10309):1407–16. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02183-8
- Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, Andrews N, Araos R, Goldberg Y, et al. Duration of effectiveness of vaccines against sars-cov-2 infection and covid-19 disease: Results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* (2022) 399(10328):924–44. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00152-0
- Israel A, Merzon E, Schaffer AA, Shenhar Y, Green I, Golan-Cohen A, et al. Elapsed time since Bnt162b2 vaccine and risk of sars-cov-2 infection: Test negative design study. *BMJ* (2021) 375:e067873. doi: 10.1136/bmj-2021-067873
- Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-specific adaptive immunity to sars-cov-2 in acute covid-19 and associations with age and disease severity. *Cell* (2020) 183(4):996–1012 e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
- Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional sars-cov-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in covid-19 patients. *Cell Rep* (2021) 34(6):108728. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728
- Zhou R, To KK, Wong YC, Liu L, Zhou B, Li X, et al. Acute sars-cov-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity* (2020) 53(4):864–77 e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.026

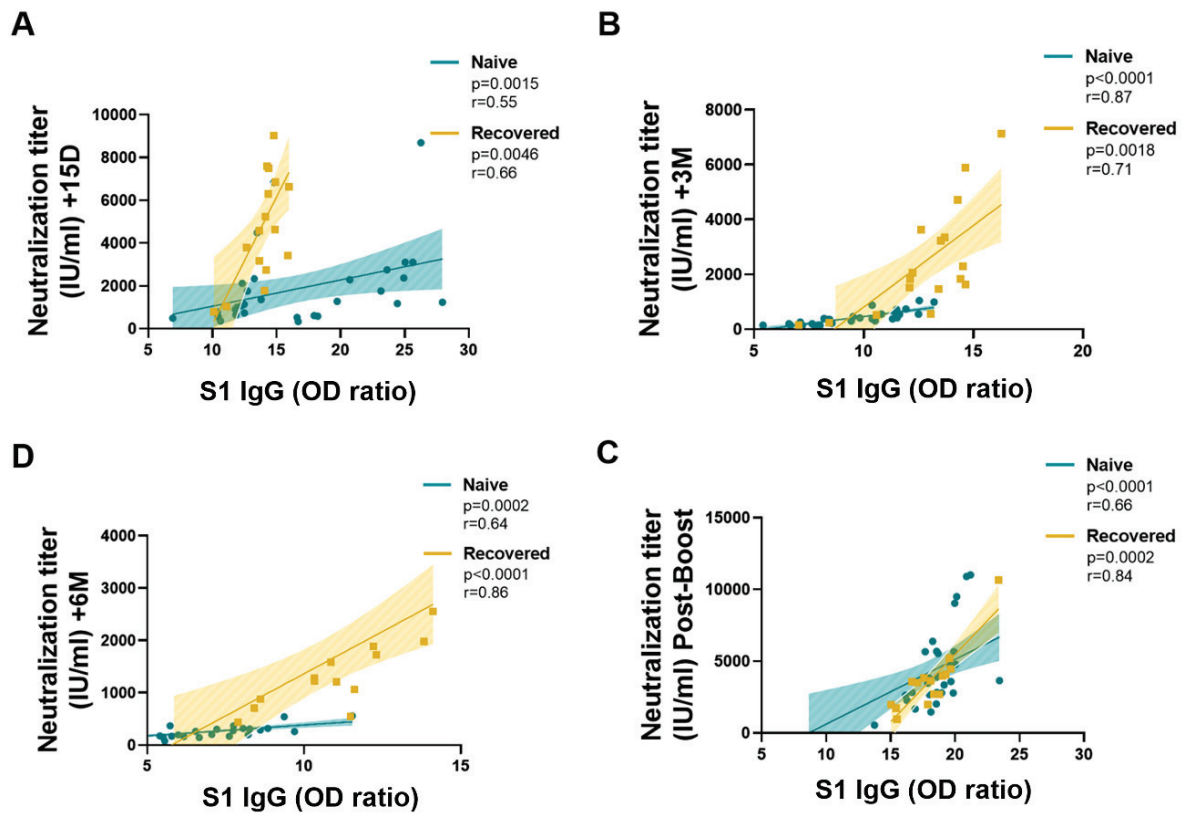
19. Almendro-Vazquez P, Laguna-Goya R, Ruiz-Ruigomez M, Utrero-Rico A, Lalueza A, Maestro de la Calle G, et al. Longitudinal dynamics of sars-Cov-2-Specific cellular and humoral immunity after natural infection or Bnt162b2 vaccination. *PLoS Pathog* (2021) 17(12):e1010211. doi: 10.1371/journal.ppat.1010211
20. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Stralin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild covid-19. *Cell* (2020) 183(1):158–68 e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.017
21. Sahin U, Muik A, Vogler I, Derhovanessian E, Kranz LM, Vormehr M, et al. Bnt162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* (2021) 595(7868):572–7. doi: 10.1038/s41586-021-03653-6
22. Tan AT, Lim JM, Le Bert N, Kunasegaran K, Chia A, Qui MD, et al. Rapid measurement of sars-Cov-2 spike T cells in whole blood from vaccinated and naturally infected individuals. *J Clin Invest* (2021) 131(17). doi: 10.1172/JCI152379
23. Bonnet B, Chabrolles H, Archimbaud C, Brebion A, Cosme J, Duthel F, et al. Decline of humoral and cellular immune responses against sars-Cov-2 6 months after full Bnt162b2 vaccination in hospital healthcare workers. *Front Immunol* (2022) 13:842912. doi: 10.3389/fimmu.2022.842912
24. Mudd PA, Minervina AA, Pogorelyy MV, Turner JS, Kim W, Kalaidina E, et al. Sars-Cov-2 mrna vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans. *Cell* (2022) 185(4):603–13 e15. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.026
25. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Method N, et al. Sars-Cov-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from alpha to omicron. *Cell* (2022) 185(5):847–59 e11. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.015
26. Accorsi EK, Britton A, Fleming-Dutra KE, Smith ZR, Shang N, Derado G, et al. Association between 3 doses of mrna covid-19 vaccine and symptomatic infection caused by the sars-Cov-2 omicron and delta variants. *JAMA* (2022) 327(7):639–51. doi: 10.1001/jama.2022.0470
27. Barda N, Dagan N, Cohen C, Hernan MA, Lipsitch M, Kohane IS, et al. Effectiveness of a third dose of the Bnt162b2 mrna covid-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: An observational study. *Lancet* (2021) 398(10316):2093–100. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02249-2
28. Spitzer A, Angel Y, Marudi O, Zeltser D, Saieg E, Goldshmidt H, et al. Association of a third dose of Bnt162b2 vaccine with incidence of sars-Cov-2 infection among health care workers in Israel. *JAMA* (2022) 327(4):341–9. doi: 10.1001/jama.2021.23641
29. Eliakim-Raz N, Leibovici-Weisman Y, Stemmer A, Ness A, Awwad M, Ghantous N, et al. Antibody titers before and after a third dose of the sars-Cov-2 Bnt162b2 vaccine in adults aged  $\geq 60$  years. *JAMA* (2021) 326(21):2203–4. doi: 10.1001/jama.2021.19885
30. Munro APS, Janani L, Cornelius V, Aley PK, Babbage G, Baxter D, et al. Safety and immunogenicity of seven covid-19 vaccines as a third dose (Booster) following two doses of Chadox1 nCoV-19 or Bnt162b2 in the uk (Cov-boost): A blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* (2021) 398(10318):2258–76. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02717-3
31. Nemet I, Kliker L, Lustig Y, Zuckerman N, Erster O, Cohen C, et al. Third Bnt162b2 vaccination neutralization of sars-Cov-2 omicron infection. *N Engl J Med* (2022) 386(5):492–4. doi: 10.1056/NEJMc2119358
32. Busa R, Sorrentino MC, Russell G, Amico G, Miceli V, Miele M, et al. Specific anti-Sars-Cov-2 humoral and cellular immune responses after booster dose of Bnt162b2 pfizer-biontech mrna-based vaccine: Integrated study of adaptive immune system components. *Front Immunol* (2022) 13:856657. doi: 10.3389/fimmu.2022.856657
33. Li Y, Wang X, Jin J, Ma Z, Liu Y, Zhang X, et al. T-Cell responses to sars-Cov-2 omicron spike epitopes with mutations after the third booster dose of an inactivated vaccine. *J Med Virol* (2022) 94(8):3998–4004. doi: 10.1002/jmv.27814
34. Matula Z, Goncz M, Beko G, Kadar B, Ajzner E, Uher F, et al. Antibody and T cell responses against sars-Cov-2 elicited by the third dose of bbibp-covr (Sinopharm) and Bnt162b2 (Pfizer-biontech) vaccines using a homologous or heterologous booster vaccination strategy. *Vaccines (Basel)* (2022) 10(4). doi: 10.3390/vaccines10040539
35. Fernandez-Ruiz M, Olea B, Almendro-Vazquez P, Gimenez E, Marcacuzco A, San Juan R, et al. T Cell-mediated response to sars-Cov-2 in liver transplant recipients with prior covid-19. *Am J Transplant* (2021) 21(8):2785–94. doi: 10.1111/ajt.16708
36. Luczkowiak J, Labiod N, Rivas G, Rolo M, Lasala F, Lora-Tamayo J, et al. Prime-boost vaccination with Bnt162b2 induces high neutralizing activity against sars-Cov-2 variants in naive and covid-19-Convalescent individuals. *Open Forum Infect Dis* (2021) 8(10):ofab468. doi: 10.1093/ofid/ofab468
37. Whitt MA. Generation of vsv pseudotypes using recombinant deltag-vsv for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J Virol Methods* (2010) 169(2):365–74. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.006
38. Luczkowiak J, Rivas G, Labiod N, Lasala F, Rolo M, Lora-Tamayo J, et al. Potency and breadth of neutralization after 3 doses of mrna vaccines in covid-19 convalescent and naive individuals. *medRxiv* (2022). doi: 10.1101/2022.03.17.22272557
39. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against sars-Cov-2 one year after infection. *Nature* (2021) 595(7867):426–31. doi: 10.1038/s41586-021-03696-9
40. Benenson S, Oster Y, Cohen Y, Nir-Paz R. Bnt162b2 mrna covid-19 vaccine effectiveness among health care workers. *N Engl J Med* (2021) 384(18):1775–7. doi: 10.1056/NEJMc2101951
41. Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner HL, Yoon SK, Meece J, et al. Interim estimates of vaccine effectiveness of Bnt162b2 and mrna-1273 covid-19 vaccines in preventing sars-Cov-2 infection among health care personnel, first responders, and other essential and frontline workers - eight U.S. locations, December 2020-march 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2021) 70(13):495–500. doi: 10.15585/mmwr.mm7013e3
42. Wall EC, Wu M, Harvey R, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, et al. Neutralising antibody activity against sars-Cov-2 vocs B.1.617.2 and B.1.351 by Bnt162b2 vaccination. *Lancet* (2021) 397(10292):2331–3. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01290-3
43. Barin B, Kasap U, Selcuk F, Volkan E, Uluckan O. Comparison of sars-Cov-2 anti-spike receptor binding domain igg antibody responses after coronavac, Bnt162b2, Chadox1 covid-19 vaccines, and a single booster dose: A prospective, longitudinal population-based study. *Lancet Microbe* (2022) 3(4):e274–e83. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00305-0
44. Earle KA, Ambrosino DM, Fiore-Gartland A, Goldblatt D, Gilbert PB, Siber GR, et al. Evidence for antibody as a protective correlate for covid-19 vaccines. *Vaccine* (2021) 39(32):4423–8. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.05.063
45. Xia H, Zou J, Kurhade C, Cai H, Yang Q, Cutler M, et al. Neutralization and durability of 2 or 3 doses of the Bnt162b2 vaccine against omicron sars-Cov-2. *Cell Host Microbe* (2022) 30(4):485–8 e3. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.015
46. Moss P. The T cell immune response against sars-Cov-2. *Nat Immunol* (2022) 23(2):186–93. doi: 10.1038/s41590-021-01122-w
47. Lu Z, Laing ED, Pena DaMata J, Pohida K, Tso MS, Samuels EC, et al. Durability of sars-Cov-2-Specific T-cell responses at 12 months postinfection. *J Infect Dis* (2021) 224(12):2010–9. doi: 10.1093/infdis/jiab543
48. Marcotte H, Piralla A, Zuo F, Du L, Cassaniti I, Wan H, et al. Immunity to sars-Cov-2 up to 15 months after infection. *iScience* (2022) 25(2):103743. doi: 10.1016/j.isci.2022.103743
49. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, Baguma R, Benede N, Suzuki A, et al. T Cell responses to sars-Cov-2 spike cross-recognize omicron. *Nature* (2022) 603(7901):488–92. doi: 10.1038/s41586-022-04460-3
50. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, Bodenheimer O, Freedman LS, Ash N, et al. Protection and waning of natural and hybrid immunity to sars-Cov-2. *N Engl J Med* (2022) 386(23):2201–12. doi: 10.1056/NEJMoa2118946
51. Nguyen THO, Cohen CA, Rowntree LC, Bull MB, Hachim A, Kedzierska K, et al. T Cells targeting sars-Cov-2: By infection, vaccination, and against future variants. *Front Med (Lausanne)* (2021) 8:793102. doi: 10.3389/fmed.2021.793102
52. Reynolds CJ, Pade C, Gibbons JM, Otter AD, Lin KM, Munoz Sandoval D, et al. Immune boosting by B.1.1.529 (Omicron) depends on previous sars-Cov-2 exposure. *Science* (2022) eabq1841. doi: 10.1126/science.abq1841
53. Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Freedman L, Kalkstein N, et al. Protection of Bnt162b2 vaccine booster against covid-19 in Israel. *N Engl J Med* (2021) 385(15):1393–400. doi: 10.1056/NEJMoa2114255
54. Goel RR, Painter MM, Lundgreen KA, Apostolidis SA, Baxter AE, Giles JR, et al. Efficient recall of omicron-reactive b cell memory after a third dose of sars-Cov-2 mrna vaccine. *Cell* (2022) 185(11):1875–87 e8. doi: 10.1016/j.cell.2022.04.009
55. Lozano-Ojalvo D, Camara C, Lopez-Granados E, Nozal P, Del Pino-Molina L, Bravo-Gallego LY, et al. Differential effects of the second sars-Cov-2 mrna vaccine dose on T cell immunity in naive and covid-19 recovered individuals. *Cell Rep* (2021) 36(8):109570. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109570
56. Mangia A, Serra N, Cocomazzi G, Giambra V, Antinucci S, Maiorana A, et al. Cellular and humoral immune responses and breakthrough infections after two doses of Bnt162b2 vaccine in healthcare workers (Hw) 180 days after the second vaccine dose. *Front Public Health* (2022) 10:847384. doi: 10.3389/fpubh.2022.847384



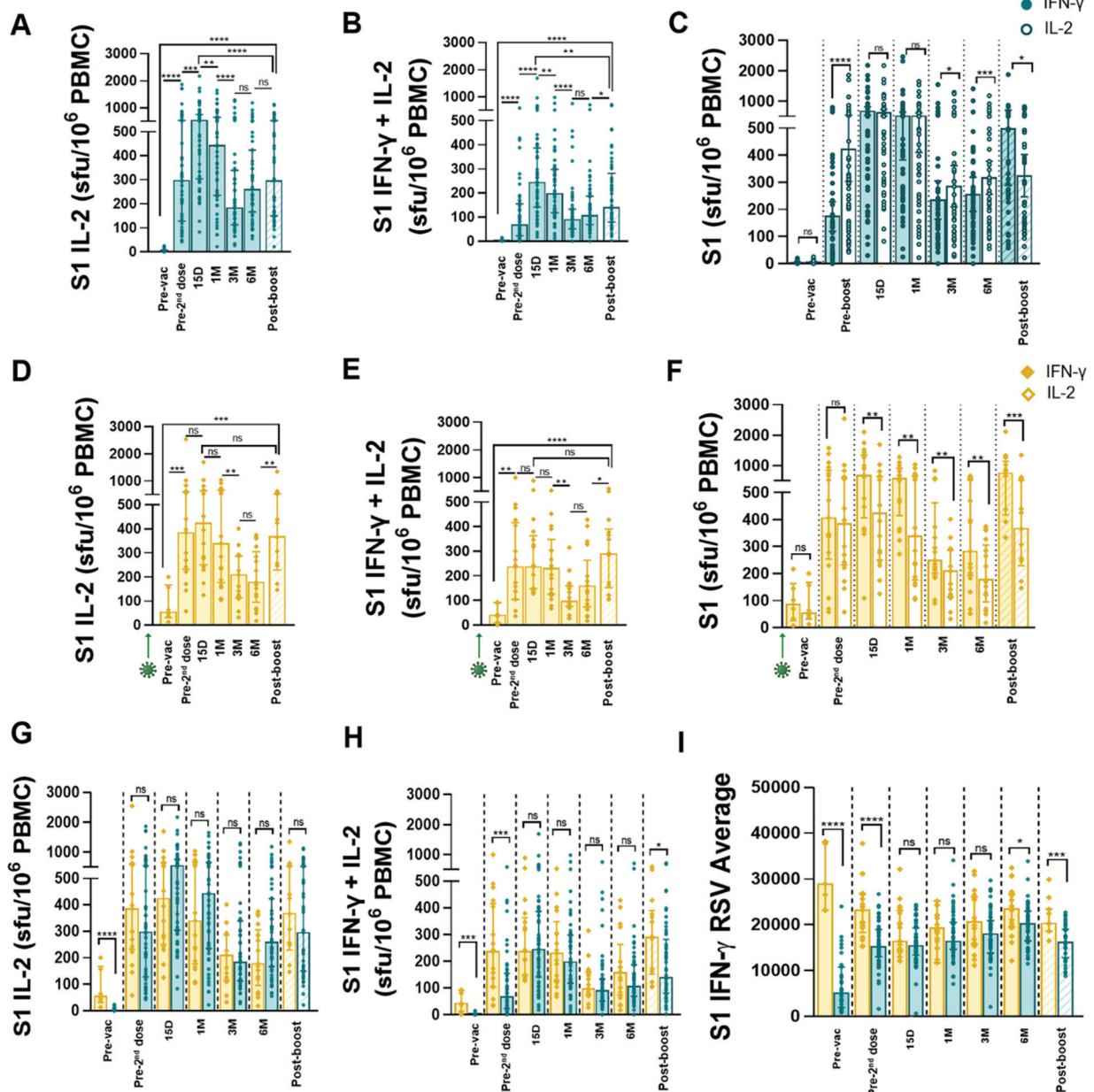
## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Figure S1. Frequency of side effects after the three vaccine doses according to prior SARS-CoV-2 infection status.** The most common side effect after vaccination was local pain followed by fatigue and myalgia. Frequency of side effects increased with repeated exposure to SARS-CoV-2, including the initial exposure to the virus in recovered subjects. The significance between groups was determined using Mann Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (See Fig. 1 footnote for more detailed information).

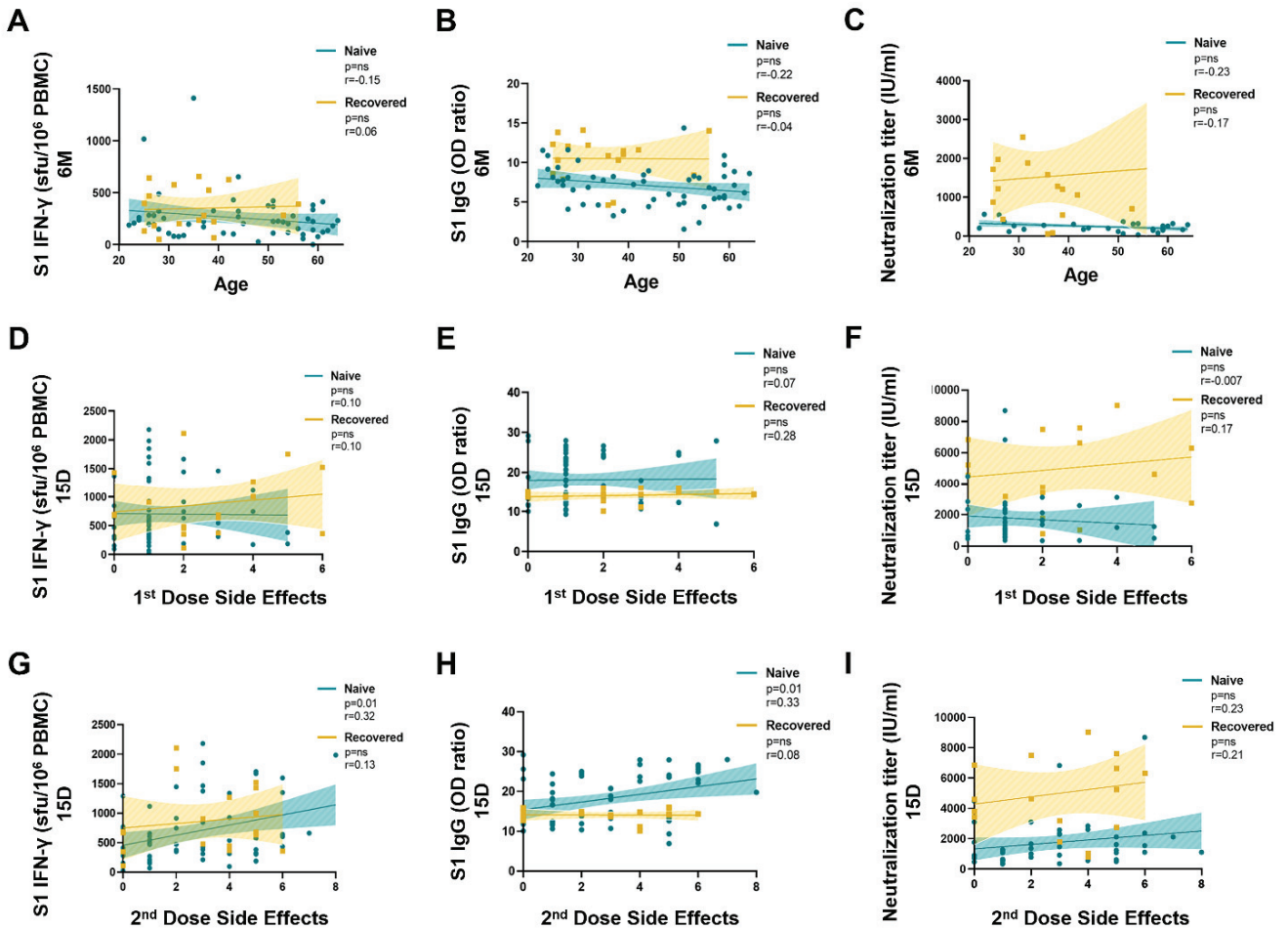


**Figure S2. Positive correlation between anti-S1 IgG and neutralization in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals.** Correlation between IgG and neutralization titers (IU/ml) measured 15 days (A), 3 months (B) and 6 months (C) after the administration of the first BNT162b2 dose and one month after the third mRNA-1273 boost dose (D). Linear regressions were performed using Spearman's rank test.

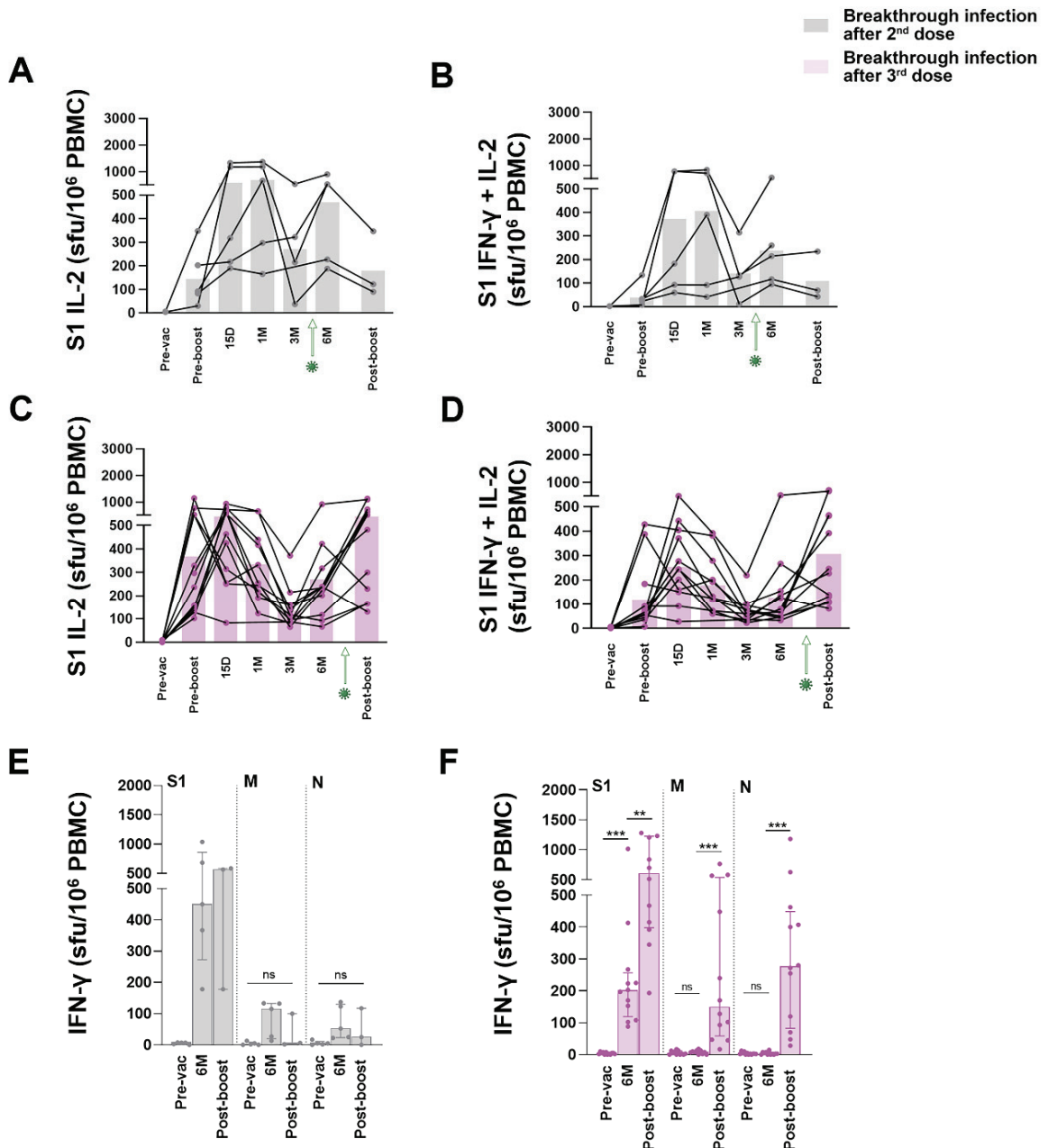


**Figure S3. Dynamics of SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$  and IL-2 cellular response after mRNA vaccination.** A-B) IL-2 (A) and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 (B) T cell responses against S1-SARS-CoV-2 protein according to the sample collection in SARS-CoV-2 naïve individuals. C) Comparison of S1-IL-2-producing and S1-IFN- $\gamma$ -producing specific T cells in naïve individuals. D-E) IL-2 (D) and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 (E) T cell responses against S1-SARS-CoV-2 protein in SARS-CoV-2 recovered individuals. F) Comparison of S1-IL-2-producing and S1-IFN- $\gamma$ -producing specific T cells in recovered

individuals. **G-H)** Comparison of IL-2 (G) and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 (H) S1-specific T cell responses between SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals. **I)** Comparison of IFN- $\gamma$  RSV after mRNA vaccination between SARS-CoV-2-naïve and -recovered individuals. Green arrows represent the time of SARS-CoV-2 infection. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney, Wilcoxon signed rank or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figure S4. Maintenance of SARS-CoV-2-specific adaptive immune response and correlations between the number of side effects suffered after mRNA vaccination and the magnitude of cellular and humoral responses in naïve and recovered COVID-19 individuals.** A-C) Correlation between age and S1 IFN- $\gamma$ -producing T cells (A), anti-S1 IgG (B) and neutralizing antibodies (C) six-months after the second BNT162b2 dose administration. D-F) Correlation between the number of side effects reported after the first BNT162b2 dose administration and the S1-IFN- $\gamma$ -producing T cells (D), anti-S1 IgG (E) and neutralizing antibodies (F) at peak levels. G-I) Correlation between the number of side effects after the second BNT162b2 dose administration and the S1-IFN- $\gamma$ -producing T cells (G), anti-S1 IgG (H) and neutralizing antibodies at peak levels. Linear regressions were performed using Spearman's rank test.



**Figure S5. Dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular response after mRNA vaccination and breakthrough infections.** IL-2 and bifunctional IFN- $\gamma$ +IL-2 T cell responses in individuals infected by SARS-CoV-2 after the second (A-B) or third (C-D) vaccine dose. SARS-CoV-2-specific IFN- $\gamma$ -producing T cell responses reactive to the S1, M and N proteins in individuals infected by SARS-CoV-2 after the second (E) or third (F) vaccine dose. Horizontal bars and whiskers represent median values and interquartile ranges, respectively. The significance between groups was determined using Mann Whitney or Kruskal-Wallis tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

# DISCUSIÓN

---

De forma general, el amplio abanico clínico de la COVID-19 se ha relacionado acertadamente con diversos factores como la edad, el sexo masculino o la presencia de comorbilidades (130,191,195). Sin embargo, es importante señalar que, aunque estos sujetos se sitúan en mayor riesgo, la enfermedad grave no se limita exclusivamente a hombres de edad avanzada con condiciones médicas preexistentes (199,384). De forma similar a lo observado en otras infecciones, la respuesta inmunitaria frente a SARS-CoV-2 puede jugar un papel importante en la evolución de la enfermedad (385,386).

En este trabajo el objetivo fue comprender la cinética de las respuestas protectoras óptimas frente a SARS-CoV-2. El reclutamiento de una cohorte longitudinal de 88 pacientes – la mayor de este tipo hasta la fecha de la publicación del artículo – con distintos niveles de gravedad, desde su llegada a urgencias y antes de la administración de tratamientos, permitió caracterizar ambas ramas de la inmunidad adaptativa desde el inicio de la infección y sin ninguna interferencia de la medicación inmunomoduladora. De esta forma, se observó que los sujetos que desarrollan una rápida respuesta celular seguida de una producción moderada de anticuerpos cursan con una COVID-19 leve. Esto concuerda con la observación general de que el desarrollo temprano de células T específicas y la posterior producción de anticuerpos neutralizantes son necesarios para el control eficaz de las infecciones víricas (387). En el extremo opuesto, los pacientes que no organizan una respuesta T específica e inician una respuesta humoral con la subsiguiente producción de altos niveles de anticuerpos, no son capaces de controlar y eliminar eficazmente el SARS-CoV-2 y desarrollan síntomas graves. La ausencia de correlación observada en nuestra cohorte entre la menor gravedad de la enfermedad y los niveles de anticuerpos y su capacidad neutralizante, también se documentó en la infección por MERS (388-390). Además, la respuesta humoral exacerbada se ha descrito ampliamente en pacientes con formas graves y críticas de COVID-19 (293,391-393). Así pues, aunque los anticuerpos neutralizantes pueden desempeñar un papel dominante en la prevención de la infección (394,395), exclusivamente niveles altos de anticuerpos no logran eliminar la infección activa (396-398). Por tanto, parece que el control adecuado de la infección aguda por SARS-CoV-2 depende de la función sincronizada de las dos ramas de la inmunidad adaptativa, donde es esencial el desarrollo coordinado de una respuesta temprana de células T seguida de una respuesta humoral controlada.

Al investigar si la respuesta celular específica frente al virus podía tener un valor pronóstico, se observó que una mayor frecuencia de células T específicas frente a la

proteína S medidas a la llegada a urgencias reduce significativamente la probabilidad de desarrollar COVID-19 grave. Dado que la edad y el sexo difieren entre los pacientes leves, moderados y graves de nuestra cohorte – el grupo de pacientes graves está enriquecido en varones añosos –, y que tanto la edad avanzada como el sexo masculino se han asociado a la gravedad de la enfermedad (59,195), realizamos un análisis multivariante. Así establecimos que la presencia de células T específicas frente a la espícula del SARS-CoV-2 a la llegada a urgencias es un factor pronóstico y protector contra el desarrollo de COVID-19 grave, independientemente de la edad y el sexo (Odds Ratio (2) por incremento de 100 *spot forming unit* (sfu) productores de IFN- $\gamma$  por 10<sup>6</sup> PBMC de 0,47 y un Intervalo de Confianza (2) del 95%: 0,20-0,87;  $p < 0,05$ ). Mientras, y replicando los hallazgos descritos en otras cohortes (59,195), la edad y el sexo masculino se mantienen como factores de riesgo independientes para el desarrollo de enfermedad grave (OR: 1,05; IC 95%: 1,01-1,10;  $p = 0,01$  y OR: 5,02; IC 95%: 1,31-26,07;  $p < 0,05$ , respectivamente). Estos resultados confirmaron y validaron estudios previos más pequeños llevados a cabo por los grupos de investigación de Bertolotti y Crotty, respectivamente (244,293), donde se sugería que el desarrollo de una respuesta funcional de células T se asocia con un curso leve de la enfermedad. Posteriormente, se han publicado numerosos artículos remarcando el papel de las células T en el control de la infección por SARS-CoV-2 (294,399,400). En este trabajo, no sólo se demuestra que los pacientes leves desarrollan células T específicas frente a SARS-CoV-2 con mayor rapidez y en mayor número si no que las células T específicas de los pacientes leves son más funcionales que las de los pacientes graves, como indica la mayor cantidad de IFN- $\gamma$  e IL-2 secretada por clon en los primeros. Asimismo, aunque en nuestra cohorte no se observa la asociación entre la carga viral y la gravedad de la enfermedad que se ha descrito en algunas series (401-403), sí se observa una correlación entre un mayor número de células T específicas y una menor carga viral en el momento del diagnóstico, lo que sugiere que los pacientes con respuestas celulares más potentes son más capaces de controlar la replicación viral. Esto podría explicar, al menos en parte, la protección conferida por las células T que se ha observado incluso en ausencia de anticuerpos específicos (404-406).

Es bien conocido que la infección por SARS-CoV-2 causa linfopenia, que se asocia con la gravedad de la COVID-19 (2,275). De manera similar, la linfopenia T también se ha vinculado con resultados adversos durante las infecciones por SARS (407,408) y

MERS (409). En nuestra cohorte, los pacientes moderados y graves mostraron una reducción de los compartimentos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), B y NK, que fue más significativa en los pacientes críticos. Además, se observó una clara reducción en la funcionalidad global de las células T en los pacientes graves. La inadecuada respuesta adaptativa desarrollada en los pacientes graves podría explicarse en parte por la profunda linfopenia y la disminución general de la respuesta celular. Sin embargo, es probable que las variaciones observadas en la respuesta adaptativa entre las formas leves, moderadas y graves de COVID-19 también se deriven de diferencias en la respuesta innata inicial de estos sujetos.

Concretamente, en pacientes graves y críticos se ha descrito una respuesta de IFN tipo I muy deteriorada, caracterizada por la ausencia de IFN- $\beta$  y una producción y actividad bajas de IFN- $\alpha$ . Hadjadj *et al.*, asociaron de forma pionera este defecto con una carga viral persistente en sangre y una respuesta inflamatoria exacerbada (250) acompañada de una firma de citoquinas inflamatorias con CXCL10, IL-6 e IL-8 elevadas (251,410,411). Poco después, Bastard *et al.* identificaron que al menos el 10% de los pacientes con neumonía COVID-19 potencialmente mortal presentan autoanticuerpos neutralizantes contra IFN de tipo I (254), mientras que Zhang *et al.* describieron que errores innatos de la inmunidad dependiente de TLR3 e IRF7 también subyacen a la COVID-19 crítica (252).

La vía de los IFN tipo I juega un papel crucial en la respuesta frente a infecciones víricas y es necesaria para iniciar las respuestas inmunitarias mediadas por células (412). Si el retraso de la respuesta innata es demasiado prolongado – debido a una evasión especialmente eficaz por parte del virus, a una inmunidad innata defectuosa o a una combinación de ambas –, el SARS-CoV-2 se replica sin control en el tracto respiratorio superior y los pulmones, al mismo tiempo que la respuesta adaptativa no se activa. Estas condiciones conducen a un daño pulmonar grave y la consiguiente necesidad de hospitalización. Ante esta situación, es posible que el sistema inmunitario innato trate de compensar la ausencia de una respuesta T específica intentando controlar el virus con una respuesta innata cada vez mayor (413). Esta conclusión se alinea con los altos niveles de citoquinas propias de la inmunidad innata (257,261,410) y de neutrófilos y macrófagos inflamatorios activados encontrados en la sangre y los pulmones de pacientes con enfermedad crítica (266,268,414,415).

Paralelamente, como también se advierte en nuestra cohorte, la edad se presenta como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de COVID-19 grave o mortal. Concretamente, la edad se ha establecido como el principal factor de riesgo en distintos estudios (416,417). En comparación con una persona de 20 años, una persona de 65 años en Estados Unidos tiene un riesgo 90 veces mayor de morir por COVID-19, y una persona de 75 años tiene un riesgo 200 veces superior (44). Al margen de ser un grupo poblacional vulnerable que suele acumular más comorbilidades (197), los individuos añosos tienen un repertorio de células T *naïve* más reducido (418,419), lo que posiblemente dificulta su capacidad para generar una rápida respuesta celular frente al virus (244). Concretamente, la gravedad de la COVID-19 se ha correlacionado inversamente con la frecuencia de células T *naïve* (295).

Coincidiendo con lo descrito en la bibliografía (195,201), el sexo también permanece como un factor de riesgo en nuestros pacientes. Y, aunque existen diferencias en los sistemas inmunitarios de hombres y mujeres (204), en el caso de la infección por SARS-CoV-2 no se han observado diferencias funcionales claras en las respuestas inmunitarias adaptativas entre ambos sexos (392,420,421). No obstante, más del 90% de los casos de personas con autoanticuerpos frente a IFN tipo I descritos por Bastard *et al.* fueron hombres (254), lo que podría sugerir que las diferencias inmunológicas relacionadas con la gravedad de la COVID-19 entre sexos se deberían predominantemente a defectos relacionados con la vía de los IFN tipo I.

Crotty *et al.*, demostraron que las células T CD4<sup>+</sup> específicas del SARS-CoV-2 presentan la asociación más fuerte con una menor gravedad de la enfermedad, en comparación con los anticuerpos y las células T CD8<sup>+</sup> (244). Aunque una de las limitaciones de nuestro estudio es la incapacidad para diferenciar entre las respuestas T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se observa que la enfermedad leve se caracteriza por la producción de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-2, lo que coincide con la firma canónica de una respuesta Th1 antiviral descrita en las infecciones leves por SARS-CoV-2 (274,406,422), SARS (407) y MERS (423).

Por otra parte, a pesar de que la correlación entre la pronta respuesta celular y la disminución en la gravedad de la COVID-19 ha sido ampliamente definida, la relación entre los anticuerpos, las células T y la gravedad de la COVID-19 parece más compleja (413). La descoordinación entre los dos brazos de la respuesta adaptativa y el predominio

de la inmunidad humoral sobre la celular en los pacientes graves no están caracterizados en profundidad. Podrían deberse a una desconexión entre las respuestas de células B y T (244,293) derivada de una respuesta innata alterada que conduciría a retrasos cinéticos o desregulación en el cebado de células T (283,424).

Asimismo, nos propusimos evaluar la duración de la inmunidad adaptativa tras la infección por SARS-CoV-2 en una cohorte de 234 pacientes recuperados de COVID-19. En el primer estudio, casi la totalidad de los pacientes recuperados conservan anticuerpos y células T de memoria específicas frente a SARS-CoV-2 de 4 a 7 meses tras la infección. Concretamente, el 97% de los sujetos exhibe una respuesta celular positiva frente a al menos una de las tres proteínas evaluadas – S, N y M – seis meses después de la infección aguda. Esta respuesta de memoria se mantiene significativamente más alta frente a S en comparación con M y N, lo que concuerda con que la espícula es el antígeno del SARS-CoV-2 reconocido de forma más consistente (246,420,422).

El segundo estudio permitió identificar células T específicas hasta 22 meses después de la COVID-19. En el momento en que se publicó el artículo, esta caracterización de la memoria celular era la más extensa hasta la fecha, superando estudios anteriores que evaluaban la presencia de células T específicas frente a SARS-CoV-2 hasta los 12 (425) y los 15 meses (426) post-infección. Posteriormente, otros trabajos han caracterizado la respuesta T de memoria hasta 24 meses tras la infección aguda (427,428). En conjunto, estos hallazgos se alinean con publicaciones previas sobre la duración de la inmunidad frente a otros coronavirus que informan de la presencia de células T de memoria específicas de larga duración, hasta 17 años después del brote de SARS en 2003 (429) y hasta 2 años después de la infección aguda por MERS (388).

En nuestra cohorte, al contrario que en la fase aguda de la infección donde las respuestas de IFN- $\gamma$  e IL-2 son similares en magnitud, la respuesta T de memoria es predominantemente IL-2<sup>+</sup>. La mayor prevalencia de células T de memoria específicas del SARS-CoV-2 productoras de IL-2 podría concordar con el predominio de células T CD4<sup>+</sup>, en lugar de CD8<sup>+</sup>, como expresión de la memoria inmunitaria que se ha descrito en los trabajos de Moss y Crotty con pacientes recuperados de COVID-19 (392,430).

Por otro lado, aunque durante las primeras semanas de evolución de las infecciones graves no detectamos células T específicas frente a SARS-CoV-2 – coincidiendo con lo

descrito en otros estudios donde las células T permanecen ausentes hasta 26 días tras el inicio de los síntomas en pacientes críticos (293) – los sujetos recuperados de COVID-19 grave sí exhiben células T de memoria específicas frente al virus, lo que indica que estos individuos desarrollan una respuesta celular específica en algún momento durante la convalecencia. A pesar de que no detectamos diferencias en la respuesta celular de memoria entre los pacientes recuperados que habían sufrido formas moderadas o graves de COVID-19, aquellos que se recuperaron de infecciones graves mantienen niveles de anticuerpos significativamente superiores y con una mayor capacidad de neutralización, reflejando la asociación entre la respuesta humoral exagerada y la gravedad de la enfermedad que se observa durante la infección aguda (397,398).

Paralelamente, a pesar de la linfopenia referida durante la enfermedad grave, los sujetos recuperados de COVID-19 moderada o grave mostraron recuentos linfocitarios normales, al igual que en otras series donde la resolución de la linfopenia se correlaciona con la recuperación (431). Además, tras la infección, identificamos un estado de hiperactivación general de la respuesta celular en estos sujetos, que podría acompañar a la reconstitución inmunitaria tras una linfopenia grave.

En cuanto al mantenimiento de la respuesta adaptativa, a pesar de que el 97% y el 99% de los sujetos conservan, respectivamente, respuesta celular y humoral detectable de 4 a 7 meses tras la infección, se encontró que únicamente la respuesta celular permanece estable. Los niveles de anticuerpos, y su capacidad neutralizante, disminuyen progresiva y significativamente reproduciendo lo descrito en otros estudios (432-434). Este escenario de inmunidad humoral decreciente también se ha reportado tras las infecciones por SARS (435,436) y MERS (388). Además, la cinética diferencial entre ambas ramas de la inmunidad adaptativa frente a SARS-CoV-2 también se ha descrito en otros trabajos donde la respuesta celular tiende a permanecer estable (392,430,437) – incluso entre 1 y 2 años tras la infección (428) – mientras que los anticuerpos decaen rápidamente en la convalecencia temprana (433,434,438). A pesar de este descenso, aproximadamente el 90% de los sujetos siguen siendo seropositivos 2 años después (428). Asimismo, las células B de memoria generadas durante la COVID-19 parecen mantenerse estables entre 6 y 12 meses después (439,440) y se han detectado hasta 2 años tras la infección aguda (428).

El mantenimiento de una respuesta inmunitaria celular estable más de medio año después de la infección y la asociación del rápido desarrollo de ésta con una evolución favorable de la COVID-19, eran datos alentadores sobre la posibilidad de que las vacunas en desarrollo fueran eficaces y protectoras.

Gracias al empleo de tecnologías previamente en desarrollo, al conocimiento aprendido de otras enfermedades infecciosas – especialmente sobre otros coronavirus –, así como al acceso abierto y completo a las secuencias del genoma del SARS-CoV-2, junto con un nivel sin precedentes de colaboración internacional, financiación e intercambio de datos, se puso en marcha un esfuerzo a escala mundial para desarrollar simultáneamente diferentes vacunas contra SARS-CoV-2. Así, se organizaron estudios básicos y clínicos solapados que garantizaran un desarrollo ágil sin comprometer la seguridad. El desarrollo de estas vacunas fue increíblemente rápido, algunas fueron aprobadas por los organismos reguladores para su uso de emergencia en menos de un año desde el inicio de la pandemia (329,441). Concretamente, las vacunas de ARNm de 2 dosis BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) y mRNA-1273 (Moderna) mostraron ratios de seguridad y eficacia del 95% en la prevención de la enfermedad sintomática en los ensayos clínicos (371,442), lo que propició su administración a nivel global en diciembre de 2020. En este punto, y ante el escaso número de estudios en población general sobre el efecto de las vacunas COVID-19, nos propusimos evaluar longitudinalmente el desarrollo y mantenimiento de la respuesta adaptativa durante el programa de vacunación del personal sanitario de nuestro centro. Esto también permitió caracterizar la inmunogenicidad de las vacunas de ARNm (BNT162b2 y mRNA-1273) en individuos *naïve* para SARS-CoV-2 y con COVID-19 previa a la vacunación.

La vacunación con 2 dosis de BNT162b2 induce el desarrollo paralelo y coordinado de una respuesta celular y una robusta producción de anticuerpos en el 100% de nuestros sujetos. Este desarrollo concomitante de inmunidad celular y humoral tras la vacunación difiere de lo descrito durante la infección natural donde la inducción temprana de células T es seguida de la síntesis de anticuerpos. Aunque una única dosis de BNT162b2 induce el desarrollo de células T y anticuerpos específicos, son necesarias 2 dosis para la generación de anticuerpos con capacidad neutralizante, tal y como se describe en los ensayos clínicos de Polack y Sahin, respectivamente (370,371).

Como era esperable y también se ha comprobado en otras cohortes (367,443), BNT162b2 provoca una respuesta celular exclusiva frente a la espícula del SARS-CoV-2, mientras que las plataformas vacunales basadas en virus inactivados inducen células T capaces de reconocer varios antígenos del virus (444). Además, al igual que en la infección natural, observamos que el perfil fenotípico de las células T inducidas por la vacuna es predominantemente Th1, como se ha descrito en la bibliografía (368,370).

Al comparar la magnitud de la respuesta inducida por la infección y por la vacunación en individuos sin previa exposición al SARS-CoV-2 se observa que, a pesar de que la potencia de la respuesta T es similar en ambas situaciones, la vacuna BNT162b2 induce mayores niveles de anticuerpos, aunque con una capacidad neutralizante inferior a los formados tras la COVID-19, concordando con lo expuesto en el ensayo clínico de Sahin *et al.* (370). Asimismo, al evaluar la inmunogenicidad de la vacuna en individuos *naïve* e individuos con COVID-19 previa a la vacunación, se determina que la respuesta máxima de células T y anticuerpos inducida por 2 dosis de BNT162b2 es similar en ambas cohortes y se alcanza a los 15 días tras la segunda dosis, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía para la infección (445,446) y la vacunación (370,447). Sin embargo, la capacidad neutralizante alcanzada por los sujetos *naïve* es significativamente inferior que la desarrollada en sujetos que sufrieron la infección con anterioridad. La menor actividad neutralizante conseguida por la vacunación, en comparación con la alcanzada por la vacunación tras la infección por SARS-CoV-2, puede atribuirse, en parte, a que BNT162b2 induciría la síntesis de anticuerpos dirigidos frente a epítomos presentes en la proteína S – principalmente en el RBD – codificada por el ARNm de la vacuna. Sin embargo, estos epítomos podrían estar ocultos o inaccesibles en las espículas de los viriones de SARS-CoV-2 (448,449).

En cualquier caso, la rápida y potente inmunidad desencadenada por esta vacuna de ARNm se ha relacionado con su alta eficacia en la prevención de la infección por SARS-CoV-2, especialmente en la protección frente la enfermedad grave y la muerte (316,450,451). Asimismo, y en línea con lo observado en la infección natural, la inducción temprana de células T específicas podría explicar la rápida protección mediada por la vacuna que se ha descrito desde los 10 días tras la administración (371), cuando los anticuerpos neutralizantes son apenas detectables (370,372).

En cuanto al mantenimiento de la respuesta adaptativa, todos los vacunados – con la excepción de un individuo en lo que respecta a las células T – se mantienen por encima del umbral de positividad para la respuesta celular y humoral seis meses después de la vacunación. Tras la respuesta máxima alcanzada a las 2 semanas, los niveles de anticuerpos, y su actividad neutralizante, disminuyen gradualmente durante los 6 meses siguientes, aunque siguen siendo detectables en todos los sujetos. Esta inmunidad humoral decreciente tras la vacunación con BNT162b2 también se ha descrito en otras series (355,358,360). Por el contrario, la respuesta celular inducida por la vacunación alcanza una meseta y se mantiene estable entre los 3 y 6 meses posteriores a la segunda dosis, como se demostró en otros estudios (452,453) y reproduciendo la dinámica que se observa tras la infección natural (392,430,437). De igual forma, tras la vacunación la respuesta T de memoria también es predominante IL-2<sup>+</sup>.

Además, se aprecian distintos patrones en el mantenimiento de la respuesta tras la vacunación en individuos *naïve* y recuperados de SARS-CoV-2. Concretamente, durante los 6 meses posteriores a la segunda dosis de BNT162b2, la respuesta adaptativa específica – tanto humoral como celular – se mantiene significativamente más alta en los individuos recuperados de COVID-19 en comparación con los sujetos *naïve*. Parece, por tanto, que la vacunación refuerza la inmunidad adaptativa frente a SARS-CoV-2 en sujetos con COVID-19 previa. Este fenómeno, descrito en otras infecciones, se ha denominado inmunidad híbrida y hace referencia a individuos en los que se combina la inmunidad inducida por la infección y por la vacunación (374). Así pues, en el caso de la infección por SARS-CoV-2, y al igual que en nuestro trabajo, se han descrito títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos en individuos previamente infectados que recibieron al menos una dosis de vacuna COVID-19 (352,377). Del mismo modo, se ha observado un aumento general de la respuesta de las células T en la inmunidad híbrida en comparación con la infección o la vacunación individuales (378-380). Asimismo, en nuestro estudio esta potenciación de la respuesta adaptativa se traduce en una protección extra frente a la reinfección ya que ninguno de los sujetos con COVID-19 previa a la vacunación contrajo una nueva infección durante el periodo de seguimiento de 12 meses. Es probable que esta respuesta inmunitaria más potente y duradera se deba, al menos en parte, a que los repertorios de células T y anticuerpos generados durante la infección son de mayor amplitud que los generados por la vacunación (454,455). De esta forma, parece probable que la inclusión de antígenos víricos diferentes a la proteína S en

los nuevos diseños de vacunas puede resultar beneficiosa. Paralelamente, Bertoletti *et al.* revelaron que únicamente la vacunación con BNT162b2 no permite la detección de linfocitos T específicos residentes en la cavidad nasal, mientras que los sujetos con inmunidad híbrida exhiben respuestas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la mucosa nasal durante más 140 días, con signos mínimos de disminución (456). Estos datos sugieren que las células de memoria locales originadas durante la infección natural podrían atenuar rápidamente las reinfecciones por SARS-CoV-2 (457,458) teniendo en cuenta que los anticuerpos séricos podrían no ser suficientes para defender el epitelio olfativo (459). Por tanto, la administración intranasal de vacunas que han demostrado en modelos animales la inducción local y sistémica de respuestas inmunitarias que protegen frente a la infección por SARS-CoV-2 puede ser una opción interesante para el futuro (460-462).

En esta línea, el mayor descenso de células T y anticuerpos, así como un repertorio más limitado inducido exclusivamente por la vacunación, sitúa a los individuos *naïve* en mayor riesgo de infección, como se puede observar en nuestra cohorte. Durante los 12 meses de seguimiento se reportaron 5 infecciones por SARS-CoV-2 entre 3 y 6 meses después de completar la vacunación estándar de 2 dosis y otras 12, aproximadamente al mes de la dosis de refuerzo, coincidiendo con la ola de la altamente contagiosa Ómicron. Estas infecciones indujeron el desarrollo de células T frente a otros antígenos virales no codificados en las vacunas de ARNm como las proteínas N y M del SARS-CoV-2, al igual que se ha descrito en otros trabajos (456,463). A pesar de las infecciones de brecha, los sujetos *naïve* son el grupo que más se beneficia de la administración de una tercera dosis de refuerzo debido al marcado aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes. Concretamente, la tercera dosis produce un aumento 20 veces mayor en la capacidad de neutralización de los individuos no expuestos previamente al virus, equiparando por primera vez la actividad neutralizante en ambos grupos. Esto coincide con lo reportado en trabajos posteriores donde se expone que los refuerzos vacunales igualan los títulos de anticuerpos entre individuos con y sin inmunidad híbrida (464). Sin embargo, en los sujetos con COVID-19 previa, aunque la tercera dosis aumenta la capacidad neutralizante en comparación con la medición de los 6 meses, no consigue equiparar los niveles de anticuerpos neutralizantes alcanzados a los 15 días tras la segunda dosis. Esto podría sugerir que altos niveles preexistentes de anticuerpos o células T circulantes pueden limitar el efecto del refuerzo de la vacuna (379,465). Concretamente, estudios recientes muestran que la frecuencia e intensidad de las respuestas sistémicas de

células T no mejora con la vacunación de refuerzo (466,467). No obstante, y aunque como indican Minervina *et al.* no hay evidencias de una disfunción T tras la exposición a distintas dosis vacunales (468) – como podría ocasionar una vacunación antigripal repetida (469) – puede ser beneficioso espaciar las dosis de refuerzo en los sujetos con COVID-19 previa.

Asimismo, aunque en nuestra cohorte ninguno de los parámetros inmunitarios analizados – células T, anticuerpos o actividad neutralizante – se asoció individualmente con la protección frente a la infección de brecha, identificamos que el desarrollo de una robusta respuesta de células T y anticuerpos neutralizantes a los 15 días tras la segunda dosis se asocia con protección frente a la infección. En nuestro primer trabajo demostramos que el desarrollo de respuestas celulares y humorales tempranas y coordinadas tras la infección por SARS-CoV-2 conduce a una evolución favorable de la COVID-19, mientras que los pacientes que responden inicialmente a la infección produciendo una gran cantidad de anticuerpos tienden a desarrollar una enfermedad grave. Del mismo modo, la mayor producción de anticuerpos tras la vacunación observada en algunos sujetos *naïve* no se asocia con protección.

Por otra parte, nuestros resultados en adultos de 22 a 64 años no muestran ninguna asociación entre la edad y la intensidad de la respuesta inmunitaria celular o humoral generada por la vacuna. Mientras que algunos estudios informan de títulos óptimos de anticuerpos independientemente de la edad (470) y una reducción de las infecciones por SARS-CoV-2 en ancianos vacunados (471), la mayoría describen una inmunogenicidad humoral y celular débil de la vacuna BNT162b2 en personas de edad avanzada (472-474). Por lo que parece que los individuos añosos constituyen una población de alto riesgo en la que se justifican medidas específicas para potenciar las respuestas vacunales, especialmente en los escenarios de circulación de VoC.

En este contexto, se ha demostrado que tanto las células T resultantes de la infección por SARS-CoV-2 (475-477) como por la vacunación (452,453,478) son capaces de reconocer de forma cruzada las diferentes VoC. Concretamente, el impacto de las mutaciones en las primeras VoC (Alfa, Beta, Gamma y Épsilon) es limitado, por lo que se conservan la mayoría de las respuestas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (350,475,477). No obstante, estudios sobre variantes más recientes como Ómicron – que presenta más de 50 mutaciones, 37 de ellas en la proteína S (479) – indican que se mantiene alrededor del 70-

90% de las respuestas celulares (476,480). En particular, las células T inducidas por vacunas muestran una elevada reactividad cruzada (cercana al 80%) contra Ómicron (480-482), incluso en ausencia de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes (483,484). Además, también se ha descrito que la infección previa por SARS o coronavirus estacionales induce una inmunidad de células T multiespecífica y duradera frente a SARS-CoV-2 (429,485,486), que es más frecuente entre niños y adultos jóvenes y se dirige principalmente contra el dominio S2 de la proteína S, probablemente debido a su superior conservación de aminoácidos en comparación con S1 (487,488). En este sentido se están explorando novedosos enfoques con el objetivo de desarrollar vacunas de protección amplia o universal ya sea contra los coronavirus en general, un subconjunto de esta familia o frente a una única especie, con el propósito de establecer una vacuna panvariante o "a prueba de variantes" (489).

La menor probabilidad de escape frente a la respuesta celular de las nuevas variantes del SARS-CoV-2 puede deberse, al menos en parte, al alto polimorfismo del sistema HLA. Como resultado, el conjunto de epítomos virales reconocidos por los linfocitos T de cada individuo puede ser diferente, lo que, en general, amplía el espectro de péptidos presentados a nivel poblacional, reduciendo en gran medida la probabilidad de escape inmunitario (490,491). Sin embargo, la acumulación de mutaciones en la proteína S de las VoC (492) les confiere una mayor capacidad para evadir la acción de los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección (127,493,494) y la vacunación (125,495,496). En este punto, la aplicación de nuevas vacunas que contienen cantidades parejas de ARNm que codifican para la proteína S ancestral del SARS-CoV-2 y de las variantes Beta u Ómicron (497,498) mejora la respuesta inmunitaria humoral, induciendo una actividad neutralizante superior y más duradera frente a las VoC en comparación con las formulaciones de vacunas monovalentes (499,500).

A pesar de la creciente tasa de infección relacionada con las sucesivas oleadas de VoC (501,502), la protección conferida por las vacunas contra la hospitalización y la muerte debidas a la reinfección se ha mantenido extremadamente alta (503,504). Dada la disminución de la inmunidad humoral después de la infección y la vacunación (432,434,503) y la capacidad de las VoC para evadir los anticuerpos neutralizantes (127,494), se puede sugerir que las células T desempeñan un papel crucial en la protección contra la COVID-19 grave, incluso en el contexto de la infección por VoC.

En conjunto, los resultados aquí expuestos ponen de manifiesto la importancia de vigilar las respuestas inmunitarias celulares específicas frente a SARS-CoV-2, y no sólo los niveles de anticuerpos, ya que proporciona información sobre el pronóstico de la enfermedad y los correlatos de protección tras la infección y/o la vacunación. Especialmente considerando que los títulos de anticuerpos séricos no predicen fielmente la presencia de células T específicas frente al virus (392) y, por tanto, el uso exclusivo de pruebas de serodiagnóstico no es un indicador sólido de la inmunidad protectora frente a SARS-CoV-2. Asimismo, permite la identificación de perfiles inmunológicos que podrían tenerse en cuenta para personalizar próximas estrategias de vacunación.

# CONCLUSIONES

---



Según los objetivos generales planteados, y el desarrollo de los trabajos de investigación descritos en la presente memoria se han establecido las siguientes conclusiones:

1. La dinámica de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a SARS-CoV-2 se asocia con la gravedad de la COVID-19. La inducción de una respuesta celular temprana es esencial para el control de la infección. Los pacientes que fracasan en el desarrollo de inmunidad T específica progresan a formas graves de la enfermedad y acumulan mayor mortalidad.
2. La presencia de células T específicas frente a SARS-CoV-2 a la llegada a urgencias mejora el pronóstico y es un factor protector contra el desarrollo de COVID-19 grave, independientemente de la edad y el sexo.
3. Entre los pacientes recuperados de COVID-19, el 97% y el 99% mantienen, respectivamente, respuesta celular y humoral de 4 a 7 meses tras la infección, observándose una disminución progresiva únicamente de los niveles de anticuerpos y su actividad neutralizante. Además, las células T de memoria específicas frente al virus son detectables en sangre periférica hasta 22 meses después de la infección aguda.
4. La vacunación con dos dosis de BNT162b2 de Pfizer/BioNTech induce el desarrollo paralelo y coordinado de una respuesta celular – exclusivamente Th1 – y una robusta producción de anticuerpos – IgG y neutralizantes – frente a la espícula del SARS-CoV-2, cuya máxima magnitud se alcanza a los 15 días tras la segunda dosis. Tras la vacunación, la respuesta celular se mantiene estable entre 3 y 6 meses, sin embargo, la respuesta humoral disminuye significativa y progresivamente.
5. La vacunación BNT162b2 refuerza la inmunidad adaptativa frente a SARS-CoV-2 en sujetos con COVID-19 previa. Estos sujetos con inmunidad híbrida exhiben, durante los 6 meses posteriores a la segunda dosis, una respuesta celular y humoral significativamente superior a la de los individuos *naïve*, presentando estos últimos mayor riesgo de infección.

6. Los sujetos *naïve* para SARS-CoV-2 son el grupo que más se beneficia de la administración de una tercera dosis de refuerzo debido al marcado aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes.
7. La cuantificación simultánea de la respuesta celular y humoral proporciona información sobre el pronóstico y la protección frente a la infección por SARS-CoV-2, permitiendo, además, la identificación de perfiles inmunológicos que podrían tenerse en cuenta para personalizar estrategias de vacunación futuras.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- 1 Chams, N., Chams, S., Badran, R. *et al.* COVID-19: A Multidisciplinary Review. *Front Public Health* **8**, 383, doi:10.3389/fpubh.2020.00383 (2020).
- 2 Huang, C., Wang, Y., Li, X. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).
- 3 Hui, D. S., E, I. A., Madani, T. A. *et al.* The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* **91**, 264-266, doi:10.1016/j.ijid.2020.01.009 (2020).
- 4 Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* **323**, 1239-1242, doi:10.1001/jama.2020.2648 (2020).
- 5 Chen, N., Zhou, M., Dong, X. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* **395**, 507-513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7 (2020).
- 6 Wu, F., Zhao, S., Yu, B. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265-269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3 (2020).
- 7 Zhu, N., Zhang, D., Wang, W. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).
- 8 Chen, L., Liu, W., Zhang, Q. *et al.* RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg Microbes Infect* **9**, 313-319, doi:10.1080/22221751.2020.1725399 (2020).
- 9 Gralinski, L. E. & Menachery, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* **12**, doi:10.3390/v12020135 (2020).
- 10 National Center Biotechnology Information (NCBI). *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3> (2020), [Accessed May 2024]
- 11 Hu, B., Guo, H., Zhou, P. & Shi, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **19**, 141-154, doi:10.1038/s41579-020-00459-7 (2021).
- 12 Chakraborty, I. & Maity, P. COVID-19 outbreak: Migration, effects on society, global environment and prevention. *Sci Total Environ* **728**, 138882, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138882 (2020).
- 13 World Health Organization (WHO). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51*, [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10) (2020), [Accessed May 2024]
- 14 World Health Organization (WHO). *WHO COVID-19 dashboard*, <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c> (2020), [Accessed May 2024]
- 15 International Monetary Fund. *A Global Strategy to Manage the Long-Term Risks of COVID-19*, <https://www.imf.org/en/Publications/WP/Issues/2022/04/04/A-Global-Strategy-to-Manage-the-Long-Term-Risks-of-COVID-19-516079> (2022), [Accessed May 2024]
- 16 Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). *Informe nº 182. Situación de COVID-19 en España.*, <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes%20COVID-19/INFORMES%20COVID-19%202023/Informe%20n%C2%BA%20182%20Situaci%C3%B3n%20actual%20de%20COVID-19%20en%20Espa%C3%B1a%20a%205%20de%20julio%20de%202023.pdf> (2023), [Accessed May 2024]

- 17 V'Kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **19**, 155-170, doi:10.1038/s41579-020-00468-6 (2021).
- 18 Cui, J., Li, F. & Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192, doi:10.1038/s41579-018-0118-9 (2019).
- 19 Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D. & Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res* **100**, 163-188, doi:10.1016/bs.aivir.2018.01.001 (2018).
- 20 Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L. *et al.* The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell* **184**, 4848-4856, doi:10.1016/j.cell.2021.08.017 (2021).
- 21 Fung, T. S. & Liu, D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol* **73**, 529-557, doi:10.1146/annurev-micro-020518-115759 (2019).
- 22 Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **20**, 270-284, doi:10.1038/s41579-022-00713-0 (2022).
- 23 de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D. & Munster, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **14**, 523-534, doi:10.1038/nrmicro.2016.81 (2016).
- 24 World Health Organization (WHO). *Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003*, <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003> (2003), [Accessed May 2024]
- 25 World Health Organization (WHO). *Middle East respiratory syndrome: global summary and assessment of risk - 16 November 2022*, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MERS-RA-2022.1> (2022), [Accessed May 2024]
- 26 World Health Organization (WHO). *Current context: the COVID-19 pandemic and continuing challenges to global health*, <https://www.who.int/about/funding/invest-in-who/investment-case-2.0/challenges> (2024), [Accessed May 2024]
- 27 Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X. *et al.* Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol* **5**, 1408-1417, doi:10.1038/s41564-020-0771-4 (2020).
- 28 Lu, R., Zhao, X., Li, J. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **395**, 565-574, doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8 (2020).
- 29 Zhou, H., Chen, X., Hu, T. *et al.* A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol* **30**, 2196-2203 e2193, doi:10.1016/j.cub.2020.05.023 (2020).
- 30 Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).
- 31 Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y. *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* **583**, 286-289, doi:10.1038/s41586-020-2313-x (2020).
- 32 Lam, T. T., Jia, N., Zhang, Y. W. *et al.* Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* **583**, 282-285, doi:10.1038/s41586-020-2169-0 (2020).
- 33 Wacharapluesadee, S., Tan, C. W., Maneeorn, P. *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun* **12**, 972, doi:10.1038/s41467-021-21240-1 (2021).
- 34 Zhou, H., Ji, J., Chen, X. *et al.* Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell* **184**, 4380-4391 e4314, doi:10.1016/j.cell.2021.06.008 (2021).

- 35 Zhang, Y. Z. & Holmes, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* **181**, 223-227, doi:10.1016/j.cell.2020.03.035 (2020).
- 36 World Health Organization (WHO). *WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part*, <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part> (2021), [Accessed May 2024]
- 37 Xiao, X., Newman, C., Buesching, C. D., Macdonald, D. W. & Zhou, Z. M. Animal sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic. *Sci Rep* **11**, 11898, doi:10.1038/s41598-021-91470-2 (2021).
- 38 Wang, C. C., Prather, K. A., Sznitman, J. *et al.* Airborne transmission of respiratory viruses. *Science* **373**, doi:10.1126/science.abd9149 (2021).
- 39 Leung, N. H. L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat Rev Microbiol* **19**, 528-545, doi:10.1038/s41579-021-00535-6 (2021).
- 40 Santarpia, J. L., Rivera, D. N., Herrera, V. L. *et al.* Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Sci Rep* **10**, 12732, doi:10.1038/s41598-020-69286-3 (2020).
- 41 Guo, Z. D., Wang, Z. Y., Zhang, S. F. *et al.* Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis* **26**, 1583-1591, doi:10.3201/eid2607.200885 (2020).
- 42 Schuit, M., Ratnesar-Shumate, S., Yolitz, J. *et al.* Airborne SARS-CoV-2 Is Rapidly Inactivated by Simulated Sunlight. *J Infect Dis* **222**, 564-571, doi:10.1093/infdis/jiaa334 (2020).
- 43 van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H. *et al.* Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* **382**, 1564-1567, doi:10.1056/NEJMc2004973 (2020).
- 44 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *COVID-19: Data & Surveillance*, [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-19-data-and-surveillance.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fscience%2Fscience-and-research.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-19-data-and-surveillance.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fscience%2Fscience-and-research.html) (2024), [Accessed May 2024]
- 45 World Health Organization (WHO). *Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?*, <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> (2021), [Accessed May 2024]
- 46 Yang, H. & Rao, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* **19**, 685-700, doi:10.1038/s41579-021-00630-8 (2021).
- 47 Wu, A., Peng, Y., Huang, B. *et al.* Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* **27**, 325-328, doi:10.1016/j.chom.2020.02.001 (2020).
- 48 Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* **3**, 237-261, doi:10.1146/annurev-virology-110615-042301 (2016).
- 49 Tortorici, M. A. & Veerler, D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res* **105**, 93-116, doi:10.1016/bs.aivir.2019.08.002 (2019).
- 50 Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T. *et al.* Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* **369**, 1586-1592, doi:10.1126/science.abd4251 (2020).
- 51 Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **367**, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
- 52 Saville, J. W., Berezuk, A. M., Srivastava, S. S. & Subramaniam, S. Three-Dimensional Visualization of Viral Structure, Entry, and Replication Underlying the Spread of SARS-CoV-2. *Chem Rev* **122**, 14066-14084, doi:10.1021/acs.chemrev.1c01062 (2022).

- 53 Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**, 459-468, doi:10.1038/s41586-020-2286-9 (2020).
- 54 Yuan, Y., Cao, D., Zhang, Y. *et al.* Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun* **8**, 15092, doi:10.1038/ncomms15092 (2017).
- 55 Song, W., Gui, M., Wang, X. & Xiang, Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* **14**, e1007236, doi:10.1371/journal.ppat.1007236 (2018).
- 56 Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292 e286, doi:10.1016/j.cell.2020.02.058 (2020).
- 57 Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L. *et al.* Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* **181**, 894-904 e899, doi:10.1016/j.cell.2020.03.045 (2020).
- 58 Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y. *et al.* Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med* **202**, 756-759, doi:10.1164/rccm.202001-0179LE (2020).
- 59 Zhou, F., Yu, T., Du, R. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054-1062, doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3 (2020).
- 60 Hikmet, F., Mear, L., Edvinsson, A. *et al.* The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol* **16**, e9610, doi:10.15252/msb.20209610 (2020).
- 61 Oudit, G. Y., Wang, K., Viveiros, A., Kellner, M. J. & Penninger, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2-at the heart of the COVID-19 pandemic. *Cell* **186**, 906-922, doi:10.1016/j.cell.2023.01.039 (2023).
- 62 Shang, J., Ye, G., Shi, K. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* **581**, 221-224, doi:10.1038/s41586-020-2179-y (2020).
- 63 Lan, J., Ge, J., Yu, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **581**, 215-220, doi:10.1038/s41586-020-2180-5 (2020).
- 64 Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**, 1864-1868, doi:10.1126/science.1116480 (2005).
- 65 Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. & Li, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol* **94**, doi:10.1128/JVI.00127-20 (2020).
- 66 Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* **5**, 562-569, doi:10.1038/s41564-020-0688-y (2020).
- 67 Chan, J. F., Yuan, S., Kok, K. H. *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* **395**, 514-523, doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9 (2020).
- 68 Ou, X., Liu, Y., Lei, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* **11**, 1620, doi:10.1038/s41467-020-15562-9 (2020).
- 69 Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D. *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856-860, doi:10.1126/science.abd2985 (2020).
- 70 Shang, J., Wan, Y., Luo, C. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 11727-11734, doi:10.1073/pnas.2003138117 (2020).

- 71 Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052 (2020).
- 72 Zhang, Q., Xiang, R., Huo, S. *et al.* Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 233, doi:10.1038/s41392-021-00653-w (2021).
- 73 Osipiuk, J., Azizi, S. A., Dvorkin, S. *et al.* Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. *Nat Commun* **12**, 743, doi:10.1038/s41467-021-21060-3 (2021).
- 74 Klemm, T., Ebert, G., Calleja, D. J. *et al.* Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J* **39**, e106275, doi:10.15252/embj.2020106275 (2020).
- 75 Jin, Z., Du, X., Xu, Y. *et al.* Structure of M(pro) from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**, 289-293, doi:10.1038/s41586-020-2223-y (2020).
- 76 Snijder, E. J., Limpens, R., de Wilde, A. H. *et al.* A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol* **18**, e3000715, doi:10.1371/journal.pbio.3000715 (2020).
- 77 Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun* **11**, 5885, doi:10.1038/s41467-020-19619-7 (2020).
- 78 Zhang, J., Lan, Y. & Sanyal, S. Membrane heist: Coronavirus host membrane remodeling during replication. *Biochimie* **179**, 229-236, doi:10.1016/j.biochi.2020.10.010 (2020).
- 79 Lou, Z. & Rao, Z. The Life of SARS-CoV-2 Inside Cells: Replication-Transcription Complex Assembly and Function. *Annu Rev Biochem* **91**, 381-401, doi:10.1146/annurev-biochem-052521-115653 (2022).
- 80 Yan, L., Zhang, Y., Ge, J. *et al.* Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat Commun* **11**, 5874, doi:10.1038/s41467-020-19770-1 (2020).
- 81 Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G. & Berisio, R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* **9**, doi:10.3390/cells9051267 (2020).
- 82 Wolff, G., Limpens, R., Zevenhoven-Dobbe, J. C. *et al.* A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* **369**, 1395-1398, doi:10.1126/science.abd3629 (2020).
- 83 Yuan, S., Peng, L., Park, J. J. *et al.* Nonstructural Protein 1 of SARS-CoV-2 Is a Potent Pathogenicity Factor Redirecting Host Protein Synthesis Machinery toward Viral RNA. *Mol Cell* **80**, 1055-1066 e1056, doi:10.1016/j.molcel.2020.10.034 (2020).
- 84 Kamitani, W., Huang, C., Narayanan, K., Lokugamage, K. G. & Makino, S. A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1134-1140, doi:10.1038/nsmb.1680 (2009).
- 85 Huang, C., Lokugamage, K. G., Rozovics, J. M. *et al.* Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *J Virol* **85**, 638-643, doi:10.1128/JVI.01806-10 (2011).
- 86 Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A. *et al.* SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 959-966, doi:10.1038/s41594-020-0511-8 (2020).
- 87 Finkel, Y., Gluck, A., Nachshon, A. *et al.* SARS-CoV-2 uses a multipronged strategy to impede host protein synthesis. *Nature* **594**, 240-245, doi:10.1038/s41586-021-03610-3 (2021).

- 88 Tidu, A., Janvier, A., Schaeffer, L. *et al.* The viral protein NSP1 acts as a ribosome gatekeeper for shutting down host translation and fostering SARS-CoV-2 translation. *RNA* **27**, 253-264, doi:10.1261/rna.078121.120 (2020).
- 89 Huang, C., Lokugamage, K. G., Rozovics, J. M. *et al.* SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog* **7**, e1002433, doi:10.1371/journal.ppat.1002433 (2011).
- 90 Kamitani, W., Narayanan, K., Huang, C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12885-12890, doi:10.1073/pnas.0603144103 (2006).
- 91 Xia, H., Cao, Z., Xie, X. *et al.* Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* **33**, 108234, doi:10.1016/j.celrep.2020.108234 (2020).
- 92 Tay, M. Z., Poh, C. M., Renia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* **20**, 363-374, doi:10.1038/s41577-020-0311-8 (2020).
- 93 Lei, X., Dong, X., Ma, R. *et al.* Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* **11**, 3810, doi:10.1038/s41467-020-17665-9 (2020).
- 94 Thoms, M., Buschauer, R., Ameismeier, M. *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* **369**, 1249-1255, doi:10.1126/science.abc8665 (2020).
- 95 Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M. & Belshaw, R. Viral mutation rates. *J Virol* **84**, 9733-9748, doi:10.1128/JVI.00694-10 (2010).
- 96 Hsu, J. C., Laurent-Rolle, M., Pawlak, J. B., Wilen, C. B. & Cresswell, P. Translational shutdown and evasion of the innate immune response by SARS-CoV-2 NSP14 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2101161118 (2021).
- 97 Yao, H., Song, Y., Chen, Y. *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell* **183**, 730-738 e713, doi:10.1016/j.cell.2020.09.018 (2020).
- 98 Ghosh, S., Dellibovi-Ragheb, T. A., Kerviel, A. *et al.* beta-Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell* **183**, 1520-1535 e1514, doi:10.1016/j.cell.2020.10.039 (2020).
- 99 Chen, D., Zheng, Q., Sun, L. *et al.* ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Dev Cell* **56**, 3250-3263 e3255, doi:10.1016/j.devcel.2021.10.006 (2021).
- 100 Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J. & Peiris, M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ* **371**, m3862, doi:10.1136/bmj.m3862 (2020).
- 101 Nieto-Torres, J. L., Verdía-Baguena, C., Jimenez-Guardeno, J. M. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* **485**, 330-339, doi:10.1016/j.virol.2015.08.010 (2015).
- 102 Mu, J., Xu, J., Zhang, L. *et al.* SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci China Life Sci* **63**, 1413-1416, doi:10.1007/s11427-020-1692-1 (2020).
- 103 Catanzaro, M., Fagiani, F., Racchi, M. *et al.* Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 84, doi:10.1038/s41392-020-0191-1 (2020).
- 104 Chen, K., Xiao, F., Hu, D. *et al.* SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN-beta Production. *Viruses* **13**, doi:10.3390/v13010047 (2020).
- 105 Mu, J., Fang, Y., Yang, Q. *et al.* SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2. *Cell Discov* **6**, 65, doi:10.1038/s41421-020-00208-3 (2020).

- 106 Zheng, Y., Zhuang, M. W., Han, L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 299, doi:10.1038/s41392-020-00438-7 (2020).
- 107 Xu, Z., Shi, L., Wang, Y. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* **8**, 420-422, doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X (2020).
- 108 Bussani, R., Schneider, E., Zentilin, L. *et al.* Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine* **61**, 103104, doi:10.1016/j.ebiom.2020.103104 (2020).
- 109 Rajah, M. M., Bernier, A., Buchrieser, J. & Schwartz, O. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *J Mol Biol* **434**, 167280, doi:10.1016/j.jmb.2021.167280 (2022).
- 110 Buchrieser, J., Dufloo, J., Hubert, M. *et al.* Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J* **39**, e106267, doi:10.15252/embj.2020106267 (2020).
- 111 Li, J., Lai, S., Gao, G. F. & Shi, W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature* **600**, 408-418, doi:10.1038/s41586-021-04188-6 (2021).
- 112 Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812-827 e819, doi:10.1016/j.cell.2020.06.043 (2020).
- 113 Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H. *et al.* SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat Commun* **12**, 848, doi:10.1038/s41467-021-21118-2 (2021).
- 114 Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E. *et al.* Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell* **183**, 739-751 e738, doi:10.1016/j.cell.2020.09.032 (2020).
- 115 Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C. *et al.* Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* **372**, doi:10.1126/science.abg3055 (2021).
- 116 Volz, E., Mishra, S., Chand, M. *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* **593**, 266-269, doi:10.1038/s41586-021-03470-x (2021).
- 117 Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **592**, 438-443, doi:10.1038/s41586-021-03402-9 (2021).
- 118 Imai, M., Halfmann, P. J., Yamayoshi, S. *et al.* Characterization of a new SARS-CoV-2 variant that emerged in Brazil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2106535118 (2021).
- 119 Li, B., Deng, A., Li, K. *et al.* Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Nat Commun* **13**, 460, doi:10.1038/s41467-022-28089-y (2022).
- 120 World Health Organization (WHO). *Tracking SARS-CoV-2 variants*, <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (2024), [Accessed May 2024]
- 121 Viana, R., Moyo, S., Amoako, D. G. *et al.* Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature* **603**, 679-686, doi:10.1038/s41586-022-04411-y (2022).
- 122 Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M. *et al.* The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **21**, 361-379, doi:10.1038/s41579-023-00878-2 (2023).

- 123 Fan, Y., Li, X., Zhang, L. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 141, doi:10.1038/s41392-022-00997-x (2022).
- 124 Mannar, D., Saville, J. W., Zhu, X. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of spike protein-ACE2 complex. *Science* **375**, 760-764, doi:10.1126/science.abn7760 (2022).
- 125 Hachmann, N. P., Miller, J., Collier, A. Y. *et al.* Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. *N Engl J Med* **387**, 86-88, doi:10.1056/NEJMc2206576 (2022).
- 126 Willett, B. J., Grove, J., MacLean, O. A. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat Microbiol* **7**, 1161-1179, doi:10.1038/s41564-022-01143-7 (2022).
- 127 Cao, Y., Wang, J., Jian, F. *et al.* Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature* **602**, 657-663, doi:10.1038/s41586-021-04385-3 (2022).
- 128 Khan, K., Karim, F., Ganga, Y. *et al.* Omicron BA.4/BA.5 escape neutralizing immunity elicited by BA.1 infection. *Nat Commun* **13**, 4686, doi:10.1038/s41467-022-32396-9 (2022).
- 129 Fu, L., Wang, B., Yuan, T. *et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* **80**, 656-665, doi:10.1016/j.jinf.2020.03.041 (2020).
- 130 Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* **382**, 1708-1720, doi:10.1056/NEJMoa2002032 (2020).
- 131 Wu, C., Chen, X., Cai, Y. *et al.* Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med* **180**, 934-943, doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994 (2020).
- 132 Chen, T., Wu, D., Chen, H. *et al.* Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ* **368**, m1091, doi:10.1136/bmj.m1091 (2020).
- 133 Wang, Y., He, Y., Tong, J. *et al.* Characterization of an Asymptomatic Cohort of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infected Individuals Outside of Wuhan, China. *Clin Infect Dis* **71**, 2132-2138, doi:10.1093/cid/ciaa629 (2020).
- 134 Glenet, M., Lebreil, A. L., Heng, L. *et al.* Asymptomatic COVID-19 Adult Outpatients identified as Significant Viable SARS-CoV-2 Shedders. *Sci Rep* **11**, 20615, doi:10.1038/s41598-021-00142-8 (2021).
- 135 Corti, D., Purcell, L. A., Snell, G. & Veessler, D. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell* **184**, 4593-4595, doi:10.1016/j.cell.2021.07.027 (2021).
- 136 Zou, X., Chen, K., Zou, J. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* **14**, 185-192, doi:10.1007/s11684-020-0754-0 (2020).
- 137 Puelles, V. G., Lutgehetmann, M., Lindenmeyer, M. T. *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* **383**, 590-592, doi:10.1056/NEJMc2011400 (2020).
- 138 Bohn, M. K., Hall, A., Sepiashvili, L. *et al.* Pathophysiology of COVID-19: Mechanisms Underlying Disease Severity and Progression. *Physiology (Bethesda)* **35**, 288-301, doi:10.1152/physiol.00019.2020 (2020).

- 139 Verity, R., Okell, L. C., Dorigatti, I. *et al.* Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis* **20**, 669-677, doi:10.1016/S1473-3099(20)30243-7 (2020).
- 140 Mason, R. J. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J* **55**, doi:10.1183/13993003.00607-2020 (2020).
- 141 Berlin, D. A., Gulick, R. M. & Martinez, F. J. Severe Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 2451-2460, doi:10.1056/NEJMcp2009575 (2020).
- 142 Karagiannidis, C., Mostert, C., Hentschker, C. *et al.* Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *Lancet Respir Med* **8**, 853-862, doi:10.1016/S2213-2600(20)30316-7 (2020).
- 143 Wang, D., Hu, B., Hu, C. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* **323**, 1061-1069, doi:10.1001/jama.2020.1585 (2020).
- 144 Force, A. D. T., Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D. *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **307**, 2526-2533, doi:10.1001/jama.2012.5669 (2012).
- 145 Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **395**, 1033-1034, doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0 (2020).
- 146 Petersen, E., Koopmans, M., Go, U. *et al.* Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis* **20**, e238-e244, doi:10.1016/S1473-3099(20)30484-9 (2020).
- 147 Magro, C., Mulvey, J. J., Berlin, D. *et al.* Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl Res* **220**, 1-13, doi:10.1016/j.trsl.2020.04.007 (2020).
- 148 Ackermann, M., Verleden, S. E., Kuehnel, M. *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 120-128, doi:10.1056/NEJMoa2015432 (2020).
- 149 Tian, S., Hu, W., Niu, L. *et al.* Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **15**, 700-704, doi:10.1016/j.jtho.2020.02.010 (2020).
- 150 Iba, T., Levy, J. H., Levi, M. & Thachil, J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost* **18**, 2103-2109, doi:10.1111/jth.14975 (2020).
- 151 Leisman, D. E., Deutschman, C. S. & Legrand, M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med* **46**, 1105-1108, doi:10.1007/s00134-020-06059-6 (2020).
- 152 Guo, T., Fan, Y., Chen, M. *et al.* Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* **5**, 811-818, doi:10.1001/jamacardio.2020.1017 (2020).
- 153 Lindner, D., Fitzek, A., Brauninger, H. *et al.* Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. *JAMA Cardiol* **5**, 1281-1285, doi:10.1001/jamacardio.2020.3551 (2020).
- 154 Bavishi, C., Bonow, R. O., Trivedi, V. *et al.* Special Article - Acute myocardial injury in patients hospitalized with COVID-19 infection: A review. *Prog Cardiovasc Dis* **63**, 682-689, doi:10.1016/j.pcad.2020.05.013 (2020).
- 155 Giustino, G., Croft, L. B., Stefanini, G. G. *et al.* Characterization of Myocardial Injury in Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol* **76**, 2043-2055, doi:10.1016/j.jacc.2020.08.069 (2020).
- 156 Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y. & Xie, X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol* **17**, 259-260, doi:10.1038/s41569-020-0360-5 (2020).

- 157 Lamers, M. M., Beumer, J., van der Vaart, J. *et al.* SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* **369**, 50-54, doi:10.1126/science.abc1669 (2020).
- 158 Wang, W., Xu, Y., Gao, R. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* **323**, 1843-1844, doi:10.1001/jama.2020.3786 (2020).
- 159 Cholankeril, G., Podboy, A., Aivaliotis, V. I. *et al.* High Prevalence of Concurrent Gastrointestinal Manifestations in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Early Experience From California. *Gastroenterology* **159**, 775-777, doi:10.1053/j.gastro.2020.04.008 (2020).
- 160 Yang, L. & Tu, L. Implications of gastrointestinal manifestations of COVID-19. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **5**, 629-630, doi:10.1016/S2468-1253(20)30132-1 (2020).
- 161 Zhang, C., Shi, L. & Wang, F. S. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **5**, 428-430, doi:10.1016/S2468-1253(20)30057-1 (2020).
- 162 Shi, H., Han, X., Jiang, N. *et al.* Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **20**, 425-434, doi:10.1016/S1473-3099(20)30086-4 (2020).
- 163 Gu, J., Han, B. & Wang, J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal-Oral Transmission. *Gastroenterology* **158**, 1518-1519, doi:10.1053/j.gastro.2020.02.054 (2020).
- 164 Effenberger, M., Grabherr, F., Mayr, L. *et al.* Faecal calprotectin indicates intestinal inflammation in COVID-19. *Gut* **69**, 1543-1544, doi:10.1136/gutjnl-2020-321388 (2020).
- 165 Matschke, J., Lutgehetmann, M., Hagel, C. *et al.* Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol* **19**, 919-929, doi:10.1016/S1474-4422(20)30308-2 (2020).
- 166 Ellul, M. A., Benjamin, L., Singh, B. *et al.* Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol* **19**, 767-783, doi:10.1016/S1474-4422(20)30221-0 (2020).
- 167 Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* **24**, 168-175, doi:10.1038/s41593-020-00758-5 (2021).
- 168 Hensley, M. K., Markantone, D. & Prescott, H. C. Neurologic Manifestations and Complications of COVID-19. *Annu Rev Med* **73**, 113-127, doi:10.1146/annurev-med-042320-010427 (2022).
- 169 Brann, D. H., Tsukahara, T., Weinreb, C. *et al.* Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci Adv* **6**, doi:10.1126/sciadv.abc5801 (2020).
- 170 Solomon, T. Neurological infection with SARS-CoV-2 - the story so far. *Nat Rev Neurol* **17**, 65-66, doi:10.1038/s41582-020-00453-w (2021).
- 171 Butowt, R., Bilinska, K. & von Bartheld, C. S. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends Neurosci* **46**, 75-90, doi:10.1016/j.tins.2022.11.003 (2023).
- 172 Wellford, S. A. & Moseman, E. A. Olfactory immune response to SARS-CoV-2. *Cell Mol Immunol* **21**, 134-143, doi:10.1038/s41423-023-01119-5 (2024).
- 173 Zazhytska, M., Kodra, A., Hoagland, D. A. *et al.* Non-cell-autonomous disruption of nuclear architecture as a potential cause of COVID-19-induced anosmia. *Cell* **185**, 1052-1064 e1012, doi:10.1016/j.cell.2022.01.024 (2022).
- 174 Mao, L., Jin, H., Wang, M. *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* **77**, 683-690, doi:10.1001/jamaneurol.2020.1127 (2020).

- 175 Romero-Sanchez, C. M., Diaz-Maroto, I., Fernandez-Diaz, E. *et al.* Neurologic manifestations in hospitalized patients with COVID-19: The ALBACOVID registry. *Neurology* **95**, e1060-e1070, doi:10.1212/WNL.0000000000009937 (2020).
- 176 Pun, B. T., Badenes, R., Heras La Calle, G. *et al.* Prevalence and risk factors for delirium in critically ill patients with COVID-19 (COVID-D): a multicentre cohort study. *Lancet Respir Med* **9**, 239-250, doi:10.1016/S2213-2600(20)30552-X (2021).
- 177 Pugin, D., Vargas, M. I., Thieffry, C. *et al.* COVID-19-related encephalopathy responsive to high-dose glucocorticoids. *Neurology* **95**, 543-546, doi:10.1212/WNL.0000000000010354 (2020).
- 178 Helms, J., Kremer, S., Merdji, H. *et al.* Delirium and encephalopathy in severe COVID-19: a cohort analysis of ICU patients. *Crit Care* **24**, 491, doi:10.1186/s13054-020-03200-1 (2020).
- 179 Benussi, A., Pilotto, A., Premi, E. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of inpatients with neurologic disease and COVID-19 in Brescia, Lombardy, Italy. *Neurology* **95**, e910-e920, doi:10.1212/WNL.0000000000009848 (2020).
- 180 Oxley, T. J., Mocco, J., Majidi, S. *et al.* Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young. *N Engl J Med* **382**, e60, doi:10.1056/NEJMc2009787 (2020).
- 181 Li, Y., Li, M., Wang, M. *et al.* Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke Vasc Neurol* **5**, 279-284, doi:10.1136/svn-2020-000431 (2020).
- 182 Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* **395**, 1417-1418, doi:10.1016/S0140-6736(20)30937-5 (2020).
- 183 Carsana, L., Sonzogni, A., Nasr, A. *et al.* Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* **20**, 1135-1140, doi:10.1016/S1473-3099(20)30434-5 (2020).
- 184 Wichmann, D., Sperhake, J. P., Lutgehetmann, M. *et al.* Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med* **173**, 268-277, doi:10.7326/M20-2003 (2020).
- 185 von Bruhl, M. L., Stark, K., Steinhart, A. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**, 819-835, doi:10.1084/jem.20112322 (2012).
- 186 Skendros, P., Mitsios, A., Chrysanthopoulou, A. *et al.* Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* **130**, 6151-6157, doi:10.1172/JCI141374 (2020).
- 187 Bonaventura, A., Vecchie, A., Dagna, L. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* **21**, 319-329, doi:10.1038/s41577-021-00536-9 (2021).
- 188 Gupta, A., Madhavan, M. V., Sehgal, K. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* **26**, 1017-1032, doi:10.1038/s41591-020-0968-3 (2020).
- 189 Casanova, J. L. & Abel, L. From rare disorders of immunity to common determinants of infection: Following the mechanistic thread. *Cell* **185**, 3086-3103, doi:10.1016/j.cell.2022.07.004 (2022).
- 190 Kousathanas, A., Pairo-Castineira, E., Rawlik, K. *et al.* Whole-genome sequencing reveals host factors underlying critical COVID-19. *Nature* **607**, 97-103, doi:10.1038/s41586-022-04576-6 (2022).
- 191 O'Driscoll, M., Ribeiro Dos Santos, G., Wang, L. *et al.* Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature* **590**, 140-145, doi:10.1038/s41586-020-2918-0 (2021).
- 192 Takahashi, T., Ellingson, M. K., Wong, P. *et al.* Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* **588**, 315-320, doi:10.1038/s41586-020-2700-3 (2020).

- 193 Shelton, J. F., Shastri, A. J., Ye, C. *et al.* Trans-ancestry analysis reveals genetic and nongenetic associations with COVID-19 susceptibility and severity. *Nat Genet* **53**, 801-808, doi:10.1038/s41588-021-00854-7 (2021).
- 194 Navaratnam, A. V., Gray, W. K., Day, J., Wendon, J. & Briggs, T. W. R. Patient factors and temporal trends associated with COVID-19 in-hospital mortality in England: an observational study using administrative data. *Lancet Respir Med* **9**, 397-406, doi:10.1016/S2213-2600(20)30579-8 (2021).
- 195 Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M. *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* **323**, 2052-2059, doi:10.1001/jama.2020.6775 (2020).
- 196 Gao, Y. D., Ding, M., Dong, X. *et al.* Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* **76**, 428-455, doi:10.1111/all.14657 (2021).
- 197 Divo, M. J., Martinez, C. H. & Mannino, D. M. Ageing and the epidemiology of multimorbidity. *Eur Respir J* **44**, 1055-1068, doi:10.1183/09031936.00059814 (2014).
- 198 Li, X., Li, C., Zhang, W. *et al.* Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct Target Ther* **8**, 239, doi:10.1038/s41392-023-01502-8 (2023).
- 199 Davies, N. G., Klepac, P., Liu, Y. *et al.* Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat Med* **26**, 1205-1211, doi:10.1038/s41591-020-0962-9 (2020).
- 200 Wu, J. T., Leung, K., Bushman, M. *et al.* Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat Med* **26**, 506-510, doi:10.1038/s41591-020-0822-7 (2020).
- 201 Yang, X., Yu, Y., Xu, J. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* **8**, 475-481, doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5 (2020).
- 202 Lott, N., Gebhard, C. E., Bengs, S. *et al.* Sex hormones in SARS-CoV-2 susceptibility: key players or confounders? *Nat Rev Endocrinol* **19**, 217-231, doi:10.1038/s41574-022-00780-6 (2023).
- 203 Gebhard, C., Regitz-Zagrosek, V., Neuhauser, H. K., Morgan, R. & Klein, S. L. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol Sex Differ* **11**, 29, doi:10.1186/s13293-020-00304-9 (2020).
- 204 Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* **16**, 626-638, doi:10.1038/nri.2016.90 (2016).
- 205 Cummings, M. J., Baldwin, M. R., Abrams, D. *et al.* Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet* **395**, 1763-1770, doi:10.1016/S0140-6736(20)31189-2 (2020).
- 206 Liu, J., Zhang, S., Wu, Z. *et al.* Clinical outcomes of COVID-19 in Wuhan, China: a large cohort study. *Ann Intensive Care* **10**, 99, doi:10.1186/s13613-020-00706-3 (2020).
- 207 Grasselli, G., Greco, M., Zanella, A. *et al.* Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med* **180**, 1345-1355, doi:10.1001/jamainternmed.2020.3539 (2020).
- 208 Chen, R., Sang, L., Jiang, M. *et al.* Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 89-100, doi:10.1016/j.jaci.2020.05.003 (2020).
- 209 Zhang, J. J., Cao, Y. Y., Tan, G. *et al.* Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. *Allergy* **76**, 533-550, doi:10.1111/all.14496 (2021).

- 210 Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**, 971-974, doi:10.1038/ni1004-971 (2004).
- 211 Abul K. Abbas, A. H. L., Shiv Pillai. *Inmunología Celular y Molecular*. (Elsevier, 2022).
- 212 Rouse, B. T. & Sehrawat, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol* **10**, 514-526, doi:10.1038/nri2802 (2010).
- 213 Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L. & Mogensen, T. H. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol* **21**, 137-150, doi:10.1038/s41577-020-0391-5 (2021).
- 214 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 215 Kanneganti, T. D. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. *Immunol Rev* **297**, 5-12, doi:10.1111/imr.12912 (2020).
- 216 Goubau, D., Deddouche, S. & Reis e Sousa, C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**, 855-869, doi:10.1016/j.immuni.2013.05.007 (2013).
- 217 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* **16**, 343-353, doi:10.1038/ni.3123 (2015).
- 218 Chaplin, D. D. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* **117**, S430-435, doi:10.1016/j.jaci.2005.09.034 (2006).
- 219 Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S33-40, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017 (2010).
- 220 Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S. *et al.* TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms* **9**, doi:10.3390/microorganisms9091820 (2021).
- 221 Poulas, K., Farsalinos, K. & Zanidis, C. Activation of TLR7 and Innate Immunity as an Efficient Method Against COVID-19 Pandemic: Imiquimod as a Potential Therapy. *Front Immunol* **11**, 1373, doi:10.3389/fimmu.2020.01373 (2020).
- 222 Li, J., Liu, Y. & Zhang, X. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. *J Virol* **84**, 6472-6482, doi:10.1128/JVI.00016-10 (2010).
- 223 Rebendenne, A., Valadao, A. L. C., Tauziet, M. *et al.* SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J Virol* **95**, doi:10.1128/JVI.02415-20 (2021).
- 224 Yin, X., Riva, L., Pu, Y. *et al.* MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* **34**, 108628, doi:10.1016/j.celrep.2020.108628 (2021).
- 225 Yamada, T., Sato, S., Sotoyama, Y. *et al.* RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. *Nat Immunol* **22**, 820-828, doi:10.1038/s41590-021-00942-0 (2021).
- 226 Thorne, L. G., Reuschl, A. K., Zuliani-Alvarez, L. *et al.* SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J* **40**, e107826, doi:10.15252/embj.2021107826 (2021).
- 227 Israelow, B., Song, E., Mao, T. *et al.* Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J Exp Med* **217**, doi:10.1084/jem.20201241 (2020).
- 228 Diamond, M. S. & Kanneganti, T. D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23**, 165-176, doi:10.1038/s41590-021-01091-0 (2022).
- 229 Liu, G., Lee, J. H., Parker, Z. M. *et al.* ISG15-dependent activation of the sensor MDA5 is antagonized by the SARS-CoV-2 papain-like protease to evade host innate immunity. *Nat Microbiol* **6**, 467-478, doi:10.1038/s41564-021-00884-1 (2021).
- 230 DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Regla-Nava, J. A. *et al.* Inhibition of NF-kappaB-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-

- infected mice increases survival. *J Virol* **88**, 913-924, doi:10.1128/JVI.02576-13 (2014).
- 231 Su, C. M., Wang, L. & Yoo, D. Activation of NF-kappaB and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. *Sci Rep* **11**, 13464, doi:10.1038/s41598-021-92941-2 (2021).
- 232 Savan, R. & Gale, M., Jr. Innate immunity and interferon in SARS-CoV-2 infection outcome. *Immunity* **56**, 1443-1450, doi:10.1016/j.immuni.2023.06.018 (2023).
- 233 Hubel, P., Urban, C., Bergant, V. *et al.* A protein-interaction network of interferon-stimulated genes extends the innate immune system landscape. *Nat Immunol* **20**, 493-502, doi:10.1038/s41590-019-0323-3 (2019).
- 234 Cervantes-Barragan, L., Züst, R., Weber, F. *et al.* Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* **109**, 1131-1137, doi:10.1182/blood-2006-05-023770 (2007).
- 235 Miorin, L., Kehrer, T., Sanchez-Aparicio, M. T. *et al.* SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 28344-28354, doi:10.1073/pnas.2016650117 (2020).
- 236 Zang, R., Case, J. B., Yutuc, E. *et al.* Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 32105-32113, doi:10.1073/pnas.2012197117 (2020).
- 237 Martin-Sancho, L., Lewinski, M. K., Pache, L. *et al.* Functional landscape of SARS-CoV-2 cellular restriction. *Mol Cell* **81**, 2656-2668 e2658, doi:10.1016/j.molcel.2021.04.008 (2021).
- 238 Shi, G., Kenney, A. D., Kudryashova, E. *et al.* Opposing activities of IFITM proteins in SARS-CoV-2 infection. *EMBO J* **40**, e106501, doi:10.15252/embj.2020106501 (2021).
- 239 Zhao, X., Zheng, S., Chen, D. *et al.* LY6E Restricts Entry of Human Coronaviruses, Including Currently Pandemic SARS-CoV-2. *J Virol* **94**, doi:10.1128/JVI.00562-20 (2020).
- 240 Pfaender, S., Mar, K. B., Michailidis, E. *et al.* LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease. *Nat Microbiol* **5**, 1330-1339, doi:10.1038/s41564-020-0769-y (2020).
- 241 Harker, J. A., Lewis, G. M., Mack, L. & Zuniga, E. I. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* **334**, 825-829, doi:10.1126/science.1208421 (2011).
- 242 Vardhana, S. A. & Wolchok, J. D. The many faces of the anti-COVID immune response. *J Exp Med* **217**, doi:10.1084/jem.20200678 (2020).
- 243 Zhang, A., Stacey, H. D., D'Agostino, M. R. *et al.* Beyond neutralization: Fc-dependent antibody effector functions in SARS-CoV-2 infection. *Nat Rev Immunol* **23**, 381-396, doi:10.1038/s41577-022-00813-1 (2023).
- 244 Rydzynski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M. *et al.* Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* **183**, 996-1012 e1019, doi:10.1016/j.cell.2020.09.038 (2020).
- 245 Juno, J. A., Tan, H. X., Lee, W. S. *et al.* Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 1428-1434, doi:10.1038/s41591-020-0995-0 (2020).
- 246 Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* **181**, 1489-1501 e1415, doi:10.1016/j.cell.2020.05.015 (2020).
- 247 Primorac, D., Vrdoljak, K., Brlek, P. *et al.* Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Front Immunol* **13**, 848582, doi:10.3389/fimmu.2022.848582 (2022).

- 248 Yang, L., Liu, S., Liu, J. *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 128, doi:10.1038/s41392-020-00243-2 (2020).
- 249 Mazzoni, A., Salvati, L., Maggi, L., Annunziato, F. & Cosmi, L. Hallmarks of immune response in COVID-19: Exploring dysregulation and exhaustion. *Semin Immunol* **55**, 101508, doi:10.1016/j.smim.2021.101508 (2021).
- 250 Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718-724, doi:10.1126/science.abc6027 (2020).
- 251 Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045 e1039, doi:10.1016/j.cell.2020.04.026 (2020).
- 252 Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z. *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, doi:10.1126/science.abd4570 (2020).
- 253 Asano, T., Boisson, B., Onodi, F. *et al.* X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol* **6**, doi:10.1126/sciimmunol.abl4348 (2021).
- 254 Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, doi:10.1126/science.abd4585 (2020).
- 255 Moore, J. B. & June, C. H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science* **368**, 473-474, doi:10.1126/science.abb8925 (2020).
- 256 Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *N Engl J Med* **383**, 2255-2273, doi:10.1056/NEJMra2026131 (2020).
- 257 Jontvedt Jorgensen, M., Holter, J. C., Christensen, E. E. *et al.* Increased interleukin-6 and macrophage chemoattractant protein-1 are associated with respiratory failure in COVID-19. *Sci Rep* **10**, 21697, doi:10.1038/s41598-020-78710-7 (2020).
- 258 Chen, G., Wu, D., Guo, W. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* **130**, 2620-2629, doi:10.1172/JCI137244 (2020).
- 259 Zhu, Z., Cai, T., Fan, L. *et al.* Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis* **95**, 332-339, doi:10.1016/j.ijid.2020.04.041 (2020).
- 260 Laguna-Goya, R., Utrero-Rico, A., Talayero, P. *et al.* IL-6-based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* **146**, 799-807 e799, doi:10.1016/j.jaci.2020.07.009 (2020).
- 261 Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H. H. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* **26**, 1636-1643, doi:10.1038/s41591-020-1051-9 (2020).
- 262 McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A. & Bridgewood, C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev* **19**, 102537, doi:10.1016/j.autrev.2020.102537 (2020).
- 263 Ruscitti, P., Berardicurti, O., Iagnocco, A. & Giacomelli, R. Cytokine storm syndrome in severe COVID-19. *Autoimmun Rev* **19**, 102562, doi:10.1016/j.autrev.2020.102562 (2020).
- 264 Zhou, T., Su, T. T., Mudianto, T. & Wang, J. Immune asynchrony in COVID-19 pathogenesis and potential immunotherapies. *J Exp Med* **217**, doi:10.1084/jem.20200674 (2020).
- 265 Giamarellos-Bourboulis, E. J., Netea, M. G., Rovina, N. *et al.* Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* **27**, 992-1000 e1003, doi:10.1016/j.chom.2020.04.009 (2020).

- 266 Liao, M., Liu, Y., Yuan, J. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* **26**, 842-844, doi:10.1038/s41591-020-0901-9 (2020).
- 267 Castanheira, F. V. S. & Kubes, P. Neutrophils during SARS-CoV-2 infection: Friend or foe? *Immunol Rev* **314**, 399-412, doi:10.1111/imr.13175 (2023).
- 268 Merad, M. & Martin, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* **20**, 355-362, doi:10.1038/s41577-020-0331-4 (2020).
- 269 Melms, J. C., Biermann, J., Huang, H. *et al.* A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. *Nature* **595**, 114-119, doi:10.1038/s41586-021-03569-1 (2021).
- 270 Chua, R. L., Lukassen, S., Trump, S. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol* **38**, 970-979, doi:10.1038/s41587-020-0602-4 (2020).
- 271 Grant, R. A., Morales-Nebreda, L., Markov, N. S. *et al.* Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature* **590**, 635-641, doi:10.1038/s41586-020-03148-w (2021).
- 272 Cillo, A. R., Somasundaram, A., Shan, F. *et al.* Bifurcated monocyte states are predictive of mortality in severe COVID-19. *bioRxiv*, doi:10.1101/2021.02.10.430499 (2021).
- 273 Witkowski, M., Tizian, C., Ferreira-Gomes, M. *et al.* Untimely TGFbeta responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature* **600**, 295-301, doi:10.1038/s41586-021-04142-6 (2021).
- 274 Weiskopf, D., Schmitz, K. S., Raadsen, M. P. *et al.* Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abd2071 (2020).
- 275 Liao, D., Zhou, F., Luo, L. *et al.* Haematological characteristics and risk factors in the classification and prognosis evaluation of COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* **7**, e671-e678, doi:10.1016/S2352-3026(20)30217-9 (2020).
- 276 Chen, Z. & John Wherry, E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* **20**, 529-536, doi:10.1038/s41577-020-0402-6 (2020).
- 277 Song, J. W., Zhang, C., Fan, X. *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun* **11**, 3410, doi:10.1038/s41467-020-17240-2 (2020).
- 278 Chen, X., Zhao, B., Qu, Y. *et al.* Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* **71**, 1937-1942, doi:10.1093/cid/ciaa449 (2020).
- 279 Jouan, Y., Guillon, A., Gonzalez, L. *et al.* Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med* **217**, doi:10.1084/jem.20200872 (2020).
- 280 Wilk, A. J., Rustagi, A., Zhao, N. Q. *et al.* A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* **26**, 1070-1076, doi:10.1038/s41591-020-0944-y (2020).
- 281 Zhou, Y., Fu, B., Zheng, X. *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev* **7**, 998-1002, doi:10.1093/nsr/nwaa041 (2020).
- 282 Laing, A. G., Lorenc, A., Del Molino Del Barrio, I. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med* **26**, 1623-1635, doi:10.1038/s41591-020-1038-6 (2020).
- 283 Arunachalam, P. S., Wimmers, F., Mok, C. K. P. *et al.* Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* **369**, 1210-1220, doi:10.1126/science.abc6261 (2020).

- 284 Peruzzi, B., Bencini, S., Capone, M. *et al.* Quantitative and qualitative alterations of circulating myeloid cells and plasmacytoid DC in SARS-CoV-2 infection. *Immunology* **161**, 345-353, doi:10.1111/imm.13254 (2020).
- 285 Saichi, M., Ladjemi, M. Z., Korniotis, S. *et al.* Single-cell RNA sequencing of blood antigen-presenting cells in severe COVID-19 reveals multi-process defects in antiviral immunity. *Nat Cell Biol* **23**, 538-551, doi:10.1038/s41556-021-00681-2 (2021).
- 286 Bost, P., Giladi, A., Liu, Y. *et al.* Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients. *Cell* **181**, 1475-1488 e1412, doi:10.1016/j.cell.2020.05.006 (2020).
- 287 Mann, E. R., Menon, M., Knight, S. B. *et al.* Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abd6197 (2020).
- 288 Sanchez-Cerrillo, I., Landete, P., Aldave, B. *et al.* COVID-19 severity associates with pulmonary redistribution of CD1c+ DCs and inflammatory transitional and nonclassical monocytes. *J Clin Invest* **130**, 6290-6300, doi:10.1172/JCI140335 (2020).
- 289 Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D. *et al.* Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* **182**, 1419-1440 e1423, doi:10.1016/j.cell.2020.08.001 (2020).
- 290 Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G. *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* **182**, 1401-1418 e1418, doi:10.1016/j.cell.2020.08.002 (2020).
- 291 Sacchi, A., Grassi, G., Bordoni, V. *et al.* Early expansion of myeloid-derived suppressor cells inhibits SARS-CoV-2 specific T-cell response and may predict fatal COVID-19 outcome. *Cell Death Dis* **11**, 921, doi:10.1038/s41419-020-03125-1 (2020).
- 292 Falck-Jones, S., Vangeti, S., Yu, M. *et al.* Functional monocytic myeloid-derived suppressor cells increase in blood but not airways and predict COVID-19 severity. *J Clin Invest* **131**, doi:10.1172/JCI144734 (2021).
- 293 Tan, A. T., Linster, M., Tan, C. W. *et al.* Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep* **34**, 108728, doi:10.1016/j.celrep.2021.108728 (2021).
- 294 Sette, A., Sidney, J. & Crotty, S. T Cell Responses to SARS-CoV-2. *Annu Rev Immunol* **41**, 343-373, doi:10.1146/annurev-immunol-101721-061120 (2023).
- 295 Mathew, D., Giles, J. R., Baxter, A. E. *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* **369**, doi:10.1126/science.abc8511 (2020).
- 296 Min, Y. Q., Huang, M., Sun, X. *et al.* Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. *Comput Struct Biotechnol J* **19**, 4217-4225, doi:10.1016/j.csbj.2021.07.023 (2021).
- 297 Silva, J. R. A., Urban, J., Araujo, E. *et al.* Exploring the Catalytic Mechanism of the RNA Cap Modification by nsp16-nsp10 Complex of SARS-CoV-2 through a QM/MM Approach. *Int J Mol Sci* **23**, doi:10.3390/ijms23010300 (2021).
- 298 Viswanathan, T., Arya, S., Chan, S. H. *et al.* Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat Commun* **11**, 3718, doi:10.1038/s41467-020-17496-8 (2020).
- 299 Xia, X. Extreme Genomic CpG Deficiency in SARS-CoV-2 and Evasion of Host Antiviral Defense. *Mol Biol Evol* **37**, 2699-2705, doi:10.1093/molbev/msaa094 (2020).
- 300 Li, X., Hou, P., Ma, W. *et al.* SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy. *Cell Mol Immunol* **19**, 67-78, doi:10.1038/s41423-021-00807-4 (2022).

- 301 Hayn, M., Hirschenberger, M., Koepke, L. *et al.* Systematic functional analysis of SARS-CoV-2 proteins uncovers viral innate immune antagonists and remaining vulnerabilities. *Cell Rep* **35**, 109126, doi:10.1016/j.celrep.2021.109126 (2021).
- 302 Baldari, C. T., Onnis, A., Andreano, E., Del Giudice, G. & Rappuoli, R. Emerging roles of SARS-CoV-2 Spike-ACE2 in immune evasion and pathogenesis. *Trends Immunol* **44**, 424-434, doi:10.1016/j.it.2023.04.001 (2023).
- 303 Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A. *et al.* SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell* **183**, 1325-1339 e1321, doi:10.1016/j.cell.2020.10.004 (2020).
- 304 Schultze, J. L. & Aschenbrenner, A. C. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* **184**, 1671-1692, doi:10.1016/j.cell.2021.02.029 (2021).
- 305 Sun, C., Xie, C., Bu, G. L., Zhong, L. Y. & Zeng, M. S. Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 202, doi:10.1038/s41392-022-01039-2 (2022).
- 306 Markov, P. V., Katzourakis, A. & Stilianakis, N. I. Antigenic evolution will lead to new SARS-CoV-2 variants with unpredictable severity. *Nat Rev Microbiol* **20**, 251-252, doi:10.1038/s41579-022-00722-z (2022).
- 307 Kraemer, M. U. G., Hill, V., Ruis, C. *et al.* Spatiotemporal invasion dynamics of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 emergence. *Science* **373**, 889-895, doi:10.1126/science.abj0113 (2021).
- 308 Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I. *et al.* Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature* **603**, 706-714, doi:10.1038/s41586-022-04474-x (2022).
- 309 Dai, L. & Gao, G. F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol* **21**, 73-82, doi:10.1038/s41577-020-00480-0 (2021).
- 310 Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F. *et al.* Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife* **9**, doi:10.7554/eLife.61312 (2020).
- 311 Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D. *et al.* Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* **29**, 463-476 e466, doi:10.1016/j.chom.2021.02.003 (2021).
- 312 Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K. *et al.* Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* **182**, 1295-1310 e1220, doi:10.1016/j.cell.2020.08.012 (2020).
- 313 Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B. *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* **19**, 409-424, doi:10.1038/s41579-021-00573-0 (2021).
- 314 Andreano, E., Piccini, G., Licastro, D. *et al.* SARS-CoV-2 escape from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2103154118 (2021).
- 315 McCarthy, K. R., Rennick, L. J., Nambulli, S. *et al.* Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science* **371**, 1139-1142, doi:10.1126/science.abf6950 (2021).
- 316 Thompson, M. G., Burgess, J. L., Naleway, A. L. *et al.* Prevention and Attenuation of Covid-19 with the BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines. *N Engl J Med* **385**, 320-329, doi:10.1056/NEJMoa2107058 (2021).
- 317 Altmann, D. M. & Boyton, R. J. COVID-19 vaccination: The road ahead. *Science* **375**, 1127-1132, doi:10.1126/science.abn1755 (2022).
- 318 Watson, O. J., Barnsley, G., Toor, J. *et al.* Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis* **22**, 1293-1302, doi:10.1016/S1473-3099(22)00320-6 (2022).

- 319 Grifoni, A., Sidney, J., Vita, R. *et al.* SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. *Cell Host Microbe* **29**, 1076-1092, doi:10.1016/j.chom.2021.05.010 (2021).
- 320 Dickey, T. H., Tang, W. K., Butler, B. *et al.* Design of the SARS-CoV-2 RBD vaccine antigen improves neutralizing antibody response. *Sci Adv* **8**, eabq8276, doi:10.1126/sciadv.abq8276 (2022).
- 321 Premkumar, L., Segovia-Chumbez, B., Jadi, R. *et al.* The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abc8413 (2020).
- 322 World Health Organization (WHO). *COVID-19 Vaccine Tracker* <https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/> (2024), [Accessed May 2024]
- 323 Jara, A., Undurraga, E. A., Gonzalez, C. *et al.* Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile. *N Engl J Med* **385**, 875-884, doi:10.1056/NEJMoa2107715 (2021).
- 324 Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A. *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 2187-2201, doi:10.1056/NEJMoa2101544 (2021).
- 325 Nordstrom, P., Ballin, M. & Nordstrom, A. Effectiveness of heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA prime-boost vaccination against symptomatic Covid-19 infection in Sweden: A nationwide cohort study. *Lancet Reg Health Eur* **11**, 100249, doi:10.1016/j.lanep.2021.100249 (2021).
- 326 Dagan, N., Barda, N., Kepten, E. *et al.* BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *N Engl J Med* **384**, 1412-1423, doi:10.1056/NEJMoa2101765 (2021).
- 327 Bruxvoort, K. J., Sy, L. S., Qian, L. *et al.* Real-world effectiveness of the mRNA-1273 vaccine against COVID-19: Interim results from a prospective observational cohort study. *Lancet Reg Health Am* **6**, 100134, doi:10.1016/j.lana.2021.100134 (2022).
- 328 Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *Vacunas contra la COVID-19: Información de vacunas autorizadas*, <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%9119/vacunas-contra-la-covid%E2%80%9119/informacion-de-vacunas-autorizadas/> (2024), [Accessed May 2024]
- 329 Chaudhary, N., Weissman, D. & Whitehead, K. A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 817-838, doi:10.1038/s41573-021-00283-5 (2021).
- 330 Barbier, A. J., Jiang, A. Y., Zhang, P., Wooster, R. & Anderson, D. G. The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. *Nat Biotechnol* **40**, 840-854, doi:10.1038/s41587-022-01294-2 (2022).
- 331 Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* **586**, 567-571, doi:10.1038/s41586-020-2622-0 (2020).
- 332 Mirtaleb, M. S., Falak, R., Heshmatnia, J. *et al.* An insight overview on COVID-19 mRNA vaccines: Advantageous, pharmacology, mechanism of action, and prospective considerations. *Int Immunopharmacol* **117**, 109934, doi:10.1016/j.intimp.2023.109934 (2023).
- 333 Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M. & Sahay, G. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* **170**, 83-112, doi:10.1016/j.addr.2020.12.014 (2021).
- 334 Sabnis, S., Kumarasinghe, E. S., Salerno, T. *et al.* A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Mol Ther* **26**, 1509-1519, doi:10.1016/j.ymthe.2018.03.010 (2018).

- 335 Burki, T. Equitable distribution of COVID-19 vaccines. *Lancet Infect Dis* **21**, 33-34, doi:10.1016/S1473-3099(20)30949-X (2021).
- 336 Ministerio de Sanidad. *Vacuna Covid-19*, <https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCoV/vacunaCovid19.htm> (2024), [Accessed May 2024]
- 337 Watanabe, Y., Mendonca, L., Allen, E. R. *et al.* Native-like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine. *ACS Cent Sci* **7**, 594-602, doi:10.1021/acscentsci.1c00080 (2021).
- 338 Jeyanathan, M., Afkhami, S., Smail, F. *et al.* Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat Rev Immunol* **20**, 615-632, doi:10.1038/s41577-020-00434-6 (2020).
- 339 van Doremalen, N., Lambe, T., Spencer, A. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* **586**, 578-582, doi:10.1038/s41586-020-2608-y (2020).
- 340 Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K. *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **396**, 467-478, doi:10.1016/S0140-6736(20)31604-4 (2020).
- 341 Voysey, M., Clemens, S. A. C., Madhi, S. A. *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* **397**, 99-111, doi:10.1016/S0140-6736(20)32661-1 (2021).
- 342 Le Gars, M., Hendriks, J., Sadoff, J. *et al.* Immunogenicity and efficacy of Ad26.COV2.S: An adenoviral vector-based COVID-19 vaccine. *Immunol Rev* **310**, 47-60, doi:10.1111/imr.13088 (2022).
- 343 Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A. *et al.* Final Analysis of Efficacy and Safety of Single-Dose Ad26.COV2.S. *N Engl J Med* **386**, 847-860, doi:10.1056/NEJMoa2117608 (2022).
- 344 Klein, N. P., Lewis, N., Goddard, K. *et al.* Surveillance for Adverse Events After COVID-19 mRNA Vaccination. *JAMA* **326**, 1390-1399, doi:10.1001/jama.2021.15072 (2021).
- 345 Food & Drug Administration (FDA). *Joint CDC and FDA Statement on Johnson & Johnson COVID-19 Vaccine*, <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/joint-cdc-and-fda-statement-johnson-johnson-covid-19-vaccine> (2021), [Accessed May 2024]
- 346 European Medicines Agency. *Vaxzevria (previously COVID-19 Vaccine AstraZeneca)*, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/dhpc/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca> (2024), [Accessed May 2024]
- 347 Tregoning, J. S., Flight, K. E., Higham, S. L., Wang, Z. & Pierce, B. F. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol* **21**, 626-636, doi:10.1038/s41577-021-00592-1 (2021).
- 348 Teijaro, J. R. & Farber, D. L. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol* **21**, 195-197, doi:10.1038/s41577-021-00526-x (2021).
- 349 Singh, A. Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. *Nat Nanotechnol* **16**, 16-24, doi:10.1038/s41565-020-00790-3 (2021).
- 350 Geers, D., Shamier, M. C., Bogers, S. *et al.* SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Sci Immunol* **6**, doi:10.1126/sciimmunol.abj1750 (2021).

- 351 Mazzoni, A., Di Lauria, N., Maggi, L. *et al.* First-dose mRNA vaccination is sufficient to reactivate immunological memory to SARS-CoV-2 in subjects who have recovered from COVID-19. *J Clin Invest* **131**, doi:10.1172/JCI149150 (2021).
- 352 Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Painter, M. M. *et al.* Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naive and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol* **6**, doi:10.1126/sciimmunol.abi6950 (2021).
- 353 Tan, A. T., Lim, J. M., Le Bert, N. *et al.* Rapid measurement of SARS-CoV-2 spike T cells in whole blood from vaccinated and naturally infected individuals. *J Clin Invest* **131**, doi:10.1172/JCI152379 (2021).
- 354 Ciabattini, A., Pastore, G., Fiorino, F. *et al.* Evidence of SARS-CoV-2-Specific Memory B Cells Six Months After Vaccination With the BNT162b2 mRNA Vaccine. *Front Immunol* **12**, 740708, doi:10.3389/fimmu.2021.740708 (2021).
- 355 Levin, E. G., Lustig, Y., Cohen, C. *et al.* Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *N Engl J Med* **385**, e84, doi:10.1056/NEJMoa2114583 (2021).
- 356 Turner, J. S., O'Halloran, J. A., Kalaidina, E. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* **596**, 109-113, doi:10.1038/s41586-021-03738-2 (2021).
- 357 Corbett, K. S., Flynn, B., Foulds, K. E. *et al.* Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med* **383**, 1544-1555, doi:10.1056/NEJMoa2024671 (2020).
- 358 Widge, A. T., Roupheal, N. G., Jackson, L. A. *et al.* Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination. *N Engl J Med* **384**, 80-82, doi:10.1056/NEJMc2032195 (2021).
- 359 Pegu, A., O'Connell, S. E., Schmidt, S. D. *et al.* Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Science* **373**, 1372-1377, doi:10.1126/science.abj4176 (2021).
- 360 Shrotri, M., Navaratnam, A. M. D., Nguyen, V. *et al.* Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1. *Lancet* **398**, 385-387, doi:10.1016/S0140-6736(21)01642-1 (2021).
- 361 Doria-Rose, N., Suthar, M. S., Makowski, M. *et al.* Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 2259-2261, doi:10.1056/NEJMc2103916 (2021).
- 362 Evans, J. P., Zeng, C., Carlin, C. *et al.* Neutralizing antibody responses elicited by SARS-CoV-2 mRNA vaccination wane over time and are boosted by breakthrough infection. *Sci Transl Med* **14**, eabn8057, doi:10.1126/scitranslmed.abn8057 (2022).
- 363 Collier, A. Y., Yu, J., McMahan, K. *et al.* Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines. *N Engl J Med* **385**, 2010-2012, doi:10.1056/NEJMc2115596 (2021).
- 364 Barouch, D. H., Stephenson, K. E., Sadoff, J. *et al.* Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COVS.2.S Vaccination. *N Engl J Med* **385**, 951-953, doi:10.1056/NEJMc2108829 (2021).
- 365 Lederer, K., Castano, D., Gomez Atria, D. *et al.* SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity* **53**, 1281-1295 e1285, doi:10.1016/j.immuni.2020.11.009 (2020).
- 366 Stephenson, K. E., Le Gars, M., Sadoff, J. *et al.* Immunogenicity of the Ad26.COVS.2.S Vaccine for COVID-19. *JAMA* **325**, 1535-1544, doi:10.1001/jama.2021.3645 (2021).
- 367 Painter, M. M., Mathew, D., Goel, R. R. *et al.* Rapid induction of antigen-specific CD4(+) T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity* **54**, 2133-2142 e2133, doi:10.1016/j.immuni.2021.08.001 (2021).

- 368 Guerrero, G., Picozza, M., D'Orso, S. *et al.* BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype. *Sci Immunol* **6**, eab15344, doi:10.1126/sciimmunol.ab15344 (2021).
- 369 Khoo, N. K. H., Lim, J. M. E., Gill, U. S. *et al.* Differential immunogenicity of homologous versus heterologous boost in Ad26.COV2.S vaccine recipients. *Med* **3**, 104-118 e104, doi:10.1016/j.medj.2021.12.004 (2022).
- 370 Sahin, U., Muik, A., Derhovanesian, E. *et al.* COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T(H)1 T cell responses. *Nature* **586**, 594-599, doi:10.1038/s41586-020-2814-7 (2020).
- 371 Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* **383**, 2603-2615, doi:10.1056/NEJMoa2034577 (2020).
- 372 Sahin, U., Muik, A., Vogler, I. *et al.* BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature* **595**, 572-577, doi:10.1038/s41586-021-03653-6 (2021).
- 373 Liu, J., Yu, J., McMahan, K. *et al.* CD8 T cells contribute to vaccine protection against SARS-CoV-2 in macaques. *Sci Immunol* **7**, eabq7647, doi:10.1126/sciimmunol.abq7647 (2022).
- 374 Sette, A. & Crotty, S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol Rev* **310**, 27-46, doi:10.1111/imr.13089 (2022).
- 375 Frieman, M., Harris, A. D., Herati, R. S. *et al.* SARS-CoV-2 vaccines for all but a single dose for COVID-19 survivors. *EBioMedicine* **68**, 103401, doi:10.1016/j.ebiom.2021.103401 (2021).
- 376 Leon, T. M., Dorabawila, V., Nelson, L. *et al.* COVID-19 Cases and Hospitalizations by COVID-19 Vaccination Status and Previous COVID-19 Diagnosis - California and New York, May-November 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **71**, 125-131, doi:10.15585/mmwr.mm7104e1 (2022).
- 377 Luczkowiak, J., Labiod, N., Rivas, G. *et al.* Neutralizing Response Against SARS-CoV-2 Variants 8 Months After BNT162b2 Vaccination in Naive and COVID-19-Convalescent Individuals. *J Infect Dis* **225**, 1905-1908, doi:10.1093/infdis/jiab634 (2022).
- 378 Payne, R. P., Longet, S., Austin, J. A. *et al.* Immunogenicity of standard and extended dosing intervals of BNT162b2 mRNA vaccine. *Cell* **184**, 5699-5714 e5611, doi:10.1016/j.cell.2021.10.011 (2021).
- 379 Lozano-Ojalvo, D., Camara, C., Lopez-Granados, E. *et al.* Differential effects of the second SARS-CoV-2 mRNA vaccine dose on T cell immunity in naive and COVID-19 recovered individuals. *Cell Rep* **36**, 109570, doi:10.1016/j.celrep.2021.109570 (2021).
- 380 Reynolds, C. J., Pade, C., Gibbons, J. M. *et al.* Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science* **372**, 1418-1423, doi:10.1126/science.abh1282 (2021).
- 381 Wratil, P. R., Stern, M., Priller, A. *et al.* Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern. *Nat Med* **28**, 496-503, doi:10.1038/s41591-022-01715-4 (2022).
- 382 Walls, A. C., Sprouse, K. R., Bowen, J. E. *et al.* SARS-CoV-2 breakthrough infections elicit potent, broad, and durable neutralizing antibody responses. *Cell* **185**, 872-880 e873, doi:10.1016/j.cell.2022.01.011 (2022).
- 383 Levine-Tiefenbrun, M., Yelin, I., Katz, R. *et al.* Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. *Nat Med* **27**, 790-792, doi:10.1038/s41591-021-01316-7 (2021).

- 384 Palmieri, L., Vanacore, N., Donfrancesco, C. *et al.* Clinical Characteristics of Hospitalized Individuals Dying With COVID-19 by Age Group in Italy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **75**, 1796-1800, doi:10.1093/gerona/glaa146 (2020).
- 385 McKechnie, J. L. & Blish, C. A. The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19? *Cell Host Microbe* **27**, 863-869, doi:10.1016/j.chom.2020.05.009 (2020).
- 386 Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C. *et al.* Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* **52**, 910-941, doi:10.1016/j.immuni.2020.05.002 (2020).
- 387 Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3-23, doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980 (2010).
- 388 Zhao, J., Alshukairi, A. N., Baharoon, S. A. *et al.* Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses. *Sci Immunol* **2**, doi:10.1126/sciimmunol.aan5393 (2017).
- 389 Drosten, C., Meyer, B., Muller, M. A. *et al.* Transmission of MERS-coronavirus in household contacts. *N Engl J Med* **371**, 828-835, doi:10.1056/NEJMoa1405858 (2014).
- 390 Sariol, A. & Perlman, S. Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity* **53**, 248-263, doi:10.1016/j.immuni.2020.07.005 (2020).
- 391 Zheng, J., Deng, Y., Zhao, Z. *et al.* Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects. *Cell Mol Immunol* **19**, 150-157, doi:10.1038/s41423-021-00774-w (2022).
- 392 Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y. *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* **371**, doi:10.1126/science.abf4063 (2021).
- 393 Cervia, C., Nilsson, J., Zurbuchen, Y. *et al.* Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* **147**, 545-557 e549, doi:10.1016/j.jaci.2020.10.040 (2021).
- 394 Kent, S. J., Houry, D. S., Reynaldi, A. *et al.* Disentangling the relative importance of T cell responses in COVID-19: leading actors or supporting cast? *Nat Rev Immunol* **22**, 387-397, doi:10.1038/s41577-022-00716-1 (2022).
- 395 Houry, D. S., Cromer, D., Reynaldi, A. *et al.* Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **27**, 1205-1211, doi:10.1038/s41591-021-01377-8 (2021).
- 396 Roltgen, K., Powell, A. E., Wirz, O. F. *et al.* Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abe0240 (2020).
- 397 Robbiani, D. F., Gaebler, C., Muecksch, F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* **584**, 437-442, doi:10.1038/s41586-020-2456-9 (2020).
- 398 Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A. *et al.* Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell* **183**, 1024-1042 e1021, doi:10.1016/j.cell.2020.09.037 (2020).
- 399 Almendro-Vazquez, P., Laguna-Goya, R. & Paz-Artal, E. Defending against SARS-CoV-2: The T cell perspective. *Front Immunol* **14**, 1107803, doi:10.3389/fimmu.2023.1107803 (2023).
- 400 Moss, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23**, 186-193, doi:10.1038/s41590-021-01122-w (2022).
- 401 Chen, W., Lan, Y., Yuan, X. *et al.* Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. *Emerg Microbes Infect* **9**, 469-473, doi:10.1080/22221751.2020.1732837 (2020).

- 402 Magleby, R., Westblade, L. F., Trzebucki, A. *et al.* Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* **73**, e4197-e4205, doi:10.1093/cid/ciaa851 (2021).
- 403 Wang, Y., Zhang, L., Sang, L. *et al.* Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest* **130**, 5235-5244, doi:10.1172/JCI138759 (2020).
- 404 Schulien, I., Kemming, J., Oberhardt, V. *et al.* Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cells. *Nat Med* **27**, 78-85, doi:10.1038/s41591-020-01143-2 (2021).
- 405 Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J. S. *et al.* SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol* **22**, 74-85, doi:10.1038/s41590-020-00808-x (2021).
- 406 Sekine, T., Perez-Potti, A., Rivera-Ballesteros, O. *et al.* Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* **183**, 158-168 e114, doi:10.1016/j.cell.2020.08.017 (2020).
- 407 Zhu, M. SARS Immunity and Vaccination. *Cell Mol Immunol* **1**, 193-198 (2004).
- 408 Wong, R. S., Wu, A., To, K. F. *et al.* Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* **326**, 1358-1362, doi:10.1136/bmj.326.7403.1358 (2003).
- 409 Zumla, A., Hui, D. S. & Perlman, S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet* **386**, 995-1007, doi:10.1016/S0140-6736(15)60454-8 (2015).
- 410 Kuri-Cervantes, L., Pampena, M. B., Meng, W. *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abd7114 (2020).
- 411 Li, S., Jiang, L., Li, X. *et al.* Clinical and pathological investigation of patients with severe COVID-19. *JCI Insight* **5**, doi:10.1172/jci.insight.138070 (2020).
- 412 McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87-103, doi:10.1038/nri3787 (2015).
- 413 Sette, A. & Crotty, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* **184**, 861-880, doi:10.1016/j.cell.2021.01.007 (2021).
- 414 Schurink, B., Roos, E., Radonic, T. *et al.* Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. *Lancet Microbe* **1**, e290-e299, doi:10.1016/S2666-5247(20)30144-0 (2020).
- 415 Radermecker, C., Detrembleur, N., Guiot, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med* **217**, doi:10.1084/jem.20201012 (2020).
- 416 Henkens, M., Raafs, A. G., Verdonschot, J. A. J. *et al.* Age is the main determinant of COVID-19 related in-hospital mortality with minimal impact of pre-existing comorbidities, a retrospective cohort study. *BMC Geriatr* **22**, 184, doi:10.1186/s12877-021-02673-1 (2022).
- 417 Semenzato, L., Botton, J., Drouin, J. *et al.* Chronic diseases, health conditions and risk of COVID-19-related hospitalization and in-hospital mortality during the first wave of the epidemic in France: a cohort study of 66 million people. *Lancet Reg Health Eur* **8**, 100158, doi:10.1016/j.lanepe.2021.100158 (2021).
- 418 Qi, Q., Liu, Y., Cheng, Y. *et al.* Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13139-13144, doi:10.1073/pnas.1409155111 (2014).
- 419 Briceno, O., Lissina, A., Wanke, K. *et al.* Reduced naive CD8(+) T-cell priming efficacy in elderly adults. *Aging Cell* **15**, 14-21, doi:10.1111/accel.12384 (2016).

- 420 Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G. *et al.* Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol* **21**, 1336-1345, doi:10.1038/s41590-020-0782-6 (2020).
- 421 Bunders, M. J. & Altfeld, M. Implications of Sex Differences in Immunity for SARS-CoV-2 Pathogenesis and Design of Therapeutic Interventions. *Immunity* **53**, 487-495, doi:10.1016/j.immuni.2020.08.003 (2020).
- 422 Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M. *et al.* SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* **587**, 270-274, doi:10.1038/s41586-020-2598-9 (2020).
- 423 Shin, H. S., Kim, Y., Kim, G. *et al.* Immune Responses to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus During the Acute and Convalescent Phases of Human Infection. *Clin Infect Dis* **68**, 984-992, doi:10.1093/cid/ciy595 (2019).
- 424 Zhou, R., To, K. K., Wong, Y. C. *et al.* Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity* **53**, 864-877 e865, doi:10.1016/j.immuni.2020.07.026 (2020).
- 425 Lu, Z., Laing, E. D., Pena DaMata, J. *et al.* Durability of SARS-CoV-2-Specific T-Cell Responses at 12 Months Postinfection. *J Infect Dis* **224**, 2010-2019, doi:10.1093/infdis/jiab543 (2021).
- 426 Marcotte, H., Piralla, A., Zuo, F. *et al.* Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection. *iScience* **25**, 103743, doi:10.1016/j.isci.2022.103743 (2022).
- 427 Gatti, A., Zizzo, G., De Paschale, M. *et al.* Assessing SARS-CoV-2-specific T-cell reactivity in late convalescents and vaccinees: Comparison and combination of QuantiFERON and activation-induced marker assays, and relation with antibody status. *PLoS One* **18**, e0285728, doi:10.1371/journal.pone.0285728 (2023).
- 428 Guo, L., Zhang, Q., Gu, X. *et al.* Durability and cross-reactive immune memory to SARS-CoV-2 in individuals 2 years after recovery from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet Microbe* **5**, e24-e33, doi:10.1016/S2666-5247(23)00255-0 (2024).
- 429 Le Bert, N., Tan, A. T., Kunasegaran, K. *et al.* SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* **584**, 457-462, doi:10.1038/s41586-020-2550-z (2020).
- 430 Zuo, J., Dowell, A. C., Pearce, H. *et al.* Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol* **22**, 620-626, doi:10.1038/s41590-021-00902-8 (2021).
- 431 Diao, B., Wang, C., Tan, Y. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* **11**, 827, doi:10.3389/fimmu.2020.00827 (2020).
- 432 Long, Q. X., Tang, X. J., Shi, Q. L. *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* **26**, 1200-1204, doi:10.1038/s41591-020-0965-6 (2020).
- 433 Ibarondo, F. J., Fulcher, J. A., Goodman-Meza, D. *et al.* Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *N Engl J Med* **383**, 1085-1087, doi:10.1056/NEJMc2025179 (2020).
- 434 Crawford, K. H. D., Dingens, A. S., Eguia, R. *et al.* Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Infect Dis* **223**, 197-205, doi:10.1093/infdis/jiaa618 (2021).
- 435 Wu, L. P., Wang, N. C., Chang, Y. H. *et al.* Duration of antibody responses after severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* **13**, 1562-1564, doi:10.3201/eid1310.070576 (2007).

- 436 Tang, F., Quan, Y., Xin, Z. T. *et al.* Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol* **186**, 7264-7268, doi:10.4049/jimmunol.0903490 (2011).
- 437 Jung, J. H., Rha, M. S., Sa, M. *et al.* SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat Commun* **12**, 4043, doi:10.1038/s41467-021-24377-1 (2021).
- 438 Bonifacius, A., Tischer-Zimmermann, S., Dragon, A. C. *et al.* COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity* **54**, 340-354 e346, doi:10.1016/j.immuni.2021.01.008 (2021).
- 439 Wang, Z., Muecksch, F., Schaefer-Babajew, D. *et al.* Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature* **595**, 426-431, doi:10.1038/s41586-021-03696-9 (2021).
- 440 Hartley, G. E., Edwards, E. S. J., Aui, P. M. *et al.* Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol* **5**, doi:10.1126/sciimmunol.abf8891 (2020).
- 441 Pecetta, S., Kratochvil, S., Kato, Y., Vadivelu, K. & Rappuoli, R. Immunology and Technology of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccines. *Pharmacol Rev* **74**, 313-339, doi:10.1124/pharmrev.120.000285 (2022).
- 442 Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* **384**, 403-416, doi:10.1056/NEJMoa2035389 (2021).
- 443 Tauzin, A., Nayrac, M., Benlarbi, M. *et al.* A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host Microbe* **29**, 1137-1150 e1136, doi:10.1016/j.chom.2021.06.001 (2021).
- 444 Bueno, S. M., Abarca, K., Gonzalez, P. A. *et al.* Safety and Immunogenicity of an Inactivated Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Vaccine in a Subgroup of Healthy Adults in Chile. *Clin Infect Dis* **75**, e792-e804, doi:10.1093/cid/ciab823 (2022).
- 445 Chandran, A., Rosenheim, J., Nageswaran, G. *et al.* Rapid synchronous type 1 IFN and virus-specific T cell responses characterize first wave non-severe SARS-CoV-2 infections. *Cell Rep Med* **3**, 100557, doi:10.1016/j.xcrm.2022.100557 (2022).
- 446 Notarbartolo, S., Ranzani, V., Bandera, A. *et al.* Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional and repertoire analyses delineate immune responses in COVID-19 patients. *Sci Immunol* **6**, doi:10.1126/sciimmunol.abg5021 (2021).
- 447 Zhang, Z., Mateus, J., Coelho, C. H. *et al.* Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell* **185**, 2434-2451 e2417, doi:10.1016/j.cell.2022.05.022 (2022).
- 448 Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K. *et al.* Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* **369**, 643-650, doi:10.1126/science.abc5902 (2020).
- 449 Chi, X., Yan, R., Zhang, J. *et al.* A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science* **369**, 650-655, doi:10.1126/science.abc6952 (2020).
- 450 Thompson, M. G., Burgess, J. L., Naleway, A. L. *et al.* Interim Estimates of Vaccine Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 Vaccines in Preventing SARS-CoV-2 Infection Among Health Care Personnel, First Responders, and Other Essential and Frontline Workers - Eight U.S. Locations, December 2020-March 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **70**, 495-500, doi:10.15585/mmwr.mm7013e3 (2021).

- 451 Benenson, S., Oster, Y., Cohen, M. J. & Nir-Paz, R. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine Effectiveness among Health Care Workers. *N Engl J Med* **384**, 1775-1777, doi:10.1056/NEJMc2101951 (2021).
- 452 Tarke, A., Coelho, C. H., Zhang, Z. *et al.* SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell* **185**, 847-859 e811, doi:10.1016/j.cell.2022.01.015 (2022).
- 453 Goel, R. R., Painter, M. M., Apostolidis, S. A. *et al.* mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science* **374**, abm0829, doi:10.1126/science.abm0829 (2021).
- 454 Reynolds, C. J., Pade, C., Gibbons, J. M. *et al.* Immune boosting by B.1.1.529 (Omicron) depends on previous SARS-CoV-2 exposure. *Science* **377**, eabq1841, doi:10.1126/science.abq1841 (2022).
- 455 Nguyen, T. H. O., Cohen, C. A., Rowntree, L. C. *et al.* T Cells Targeting SARS-CoV-2: By Infection, Vaccination, and Against Future Variants. *Front Med (Lausanne)* **8**, 793102, doi:10.3389/fmed.2021.793102 (2021).
- 456 Lim, J. M. E., Tan, A. T., Le Bert, N. *et al.* SARS-CoV-2 breakthrough infection in vaccinees induces virus-specific nasal-resident CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells of broad specificity. *J Exp Med* **219**, doi:10.1084/jem.20220780 (2022).
- 457 Roukens, A. H. E., Pothast, C. R., Konig, M. *et al.* Prolonged activation of nasal immune cell populations and development of tissue-resident SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cell responses following COVID-19. *Nat Immunol* **23**, 23-32, doi:10.1038/s41590-021-01095-w (2022).
- 458 Poon, M. M. L., Rybkina, K., Kato, Y. *et al.* SARS-CoV-2 infection generates tissue-localized immunological memory in humans. *Sci Immunol* **6**, eab19105, doi:10.1126/sciimmunol.ab19105 (2021).
- 459 Wellford, S. A., Moseman, A. P., Dao, K. *et al.* Mucosal plasma cells are required to protect the upper airway and brain from infection. *Immunity* **55**, 2118-2134 e2116, doi:10.1016/j.immuni.2022.08.017 (2022).
- 460 Perez, P., Astorgano, D., Albericio, G. *et al.* Intranasal administration of a single dose of MVA-based vaccine candidates against COVID-19 induced local and systemic immune responses and protects mice from a lethal SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol* **13**, 995235, doi:10.3389/fimmu.2022.995235 (2022).
- 461 Hassan, A. O., Kafai, N. M., Dmitriev, I. P. *et al.* A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. *Cell* **183**, 169-184 e113, doi:10.1016/j.cell.2020.08.026 (2020).
- 462 Mao, T., Israelow, B., Pena-Hernandez, M. A. *et al.* Unadjuvanted intranasal spike vaccine elicits protective mucosal immunity against sarbecoviruses. *Science* **378**, eabo2523, doi:10.1126/science.abo2523 (2022).
- 463 Koutsakos, M., Reynaldi, A., Lee, W. S. *et al.* SARS-CoV-2 breakthrough infection induces rapid memory and de novo T cell responses. *Immunity* **56**, 879-892 e874, doi:10.1016/j.immuni.2023.02.017 (2023).
- 464 Srivastava, K., Carreno, J. M., Gleason, C. *et al.* SARS-CoV-2-infection- and vaccine-induced antibody responses are long lasting with an initial waning phase followed by a stabilization phase. *Immunity* **57**, 587-599 e584, doi:10.1016/j.immuni.2024.01.017 (2024).
- 465 Goel, R. R., Painter, M. M., Lundgreen, K. A. *et al.* Efficient recall of Omicron-reactive B cell memory after a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Cell* **185**, 1875-1887 e1878, doi:10.1016/j.cell.2022.04.009 (2022).
- 466 Keeton, R., Tincho, M. B., Suzuki, A. *et al.* Impact of SARS-CoV-2 exposure history on the T cell and IgG response. *Cell Rep Med* **4**, 100898, doi:10.1016/j.xcrm.2022.100898 (2023).

- 467 Maringer, Y., Nelde, A., Schroeder, S. M. *et al.* Durable spike-specific T cell responses after different COVID-19 vaccination regimens are not further enhanced by booster vaccination. *Sci Immunol* **7**, eadd3899, doi:10.1126/sciimmunol.add3899 (2022).
- 468 Minervina, A. A., Pogorelyy, M. V., Kirk, A. M. *et al.* SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **23**, 781-790, doi:10.1038/s41590-022-01184-4 (2022).
- 469 Azim Majumder, M. A. & Razzaque, M. S. Repeated vaccination and 'vaccine exhaustion': relevance to the COVID-19 crisis. *Expert Rev Vaccines* **21**, 1011-1014, doi:10.1080/14760584.2022.2071705 (2022).
- 470 Salmeron Rios, S., Mas Romero, M., Cortes Zamora, E. B. *et al.* Immunogenicity of the BNT162b2 vaccine in frail or disabled nursing home residents: COVID-A study. *J Am Geriatr Soc* **69**, 1441-1447, doi:10.1111/jgs.17153 (2021).
- 471 Rossman, H., Shilo, S., Meir, T. *et al.* COVID-19 dynamics after a national immunization program in Israel. *Nat Med* **27**, 1055-1061, doi:10.1038/s41591-021-01337-2 (2021).
- 472 Van Praet, J. T., Vandecasteele, S., De Roo, A., De Vriese, A. S. & Reynders, M. Humoral and Cellular Immunogenicity of the BNT162b2 Messenger RNA Coronavirus Disease 2019 Vaccine in Nursing Home Residents. *Clin Infect Dis* **73**, 2145-2147, doi:10.1093/cid/ciab300 (2021).
- 473 Muller, L., Andree, M., Moskorz, W. *et al.* Age-dependent Immune Response to the Biontech/Pfizer BNT162b2 Coronavirus Disease 2019 Vaccination. *Clin Infect Dis* **73**, 2065-2072, doi:10.1093/cid/ciab381 (2021).
- 474 Collier, D. A., Ferreira, I., Kotagiri, P. *et al.* Age-related immune response heterogeneity to SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2. *Nature* **596**, 417-422, doi:10.1038/s41586-021-03739-1 (2021).
- 475 Tarke, A., Sidney, J., Methot, N. *et al.* Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4(+) and CD8(+) T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep Med* **2**, 100355, doi:10.1016/j.xcrm.2021.100355 (2021).
- 476 Gao, Y., Cai, C., Grifoni, A. *et al.* Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat Med* **28**, 472-476, doi:10.1038/s41591-022-01700-x (2022).
- 477 Riou, C., Keeton, R., Moyo-Gwete, T. *et al.* Escape from recognition of SARS-CoV-2 variant spike epitopes but overall preservation of T cell immunity. *Sci Transl Med* **14**, eabj6824, doi:10.1126/scitranslmed.abj6824 (2022).
- 478 Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H., Butt, A. A. & National Study Group for, C.-V. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *N Engl J Med* **385**, 187-189, doi:10.1056/NEJMc2104974 (2021).
- 479 Zhao, Z., Zhou, J., Tian, M. *et al.* Omicron SARS-CoV-2 mutations stabilize spike up-RBD conformation and lead to a non-RBM-binding monoclonal antibody escape. *Nat Commun* **13**, 4958, doi:10.1038/s41467-022-32665-7 (2022).
- 480 Keeton, R., Tincho, M. B., Ngomti, A. *et al.* T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature* **603**, 488-492, doi:10.1038/s41586-022-04460-3 (2022).
- 481 Liu, J., Chandrashekar, A., Sellers, D. *et al.* Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature* **603**, 493-496, doi:10.1038/s41586-022-04465-y (2022).
- 482 Jung, M. K., Jeong, S. D., Noh, J. Y. *et al.* BNT162b2-induced memory T cells respond to the Omicron variant with preserved polyfunctionality. *Nat Microbiol* **7**, 909-917, doi:10.1038/s41564-022-01123-x (2022).

- 483 Gray, G., Collie, S., Goga, A. *et al.* Effectiveness of Ad26.COV2.S and BNT162b2 Vaccines against Omicron Variant in South Africa. *N Engl J Med* **386**, 2243-2245, doi:10.1056/NEJMc2202061 (2022).
- 484 Bekker, L. G., Garrett, N., Goga, A. *et al.* Effectiveness of the Ad26.COV2.S vaccine in health-care workers in South Africa (the Sisonke study): results from a single-arm, open-label, phase 3B, implementation study. *Lancet* **399**, 1141-1153, doi:10.1016/S0140-6736(22)00007-1 (2022).
- 485 Swadling, L., Diniz, M. O., Schmidt, N. M. *et al.* Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature* **601**, 110-117, doi:10.1038/s41586-021-04186-8 (2022).
- 486 Lineburg, K. E., Grant, E. J., Swaminathan, S. *et al.* CD8(+) T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope cross-react with selective seasonal coronaviruses. *Immunity* **54**, 1055-1065 e1055, doi:10.1016/j.immuni.2021.04.006 (2021).
- 487 Khan, T., Rahman, M., Ali, F. A. *et al.* Distinct antibody repertoires against endemic human coronaviruses in children and adults. *JCI Insight* **6**, doi:10.1172/jci.insight.144499 (2021).
- 488 Dowell, A. C., Butler, M. S., Jinks, E. *et al.* Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol* **23**, 40-49, doi:10.1038/s41590-021-01089-8 (2022).
- 489 Cankat, S., Demael, M. U. & Swadling, L. In search of a pan-coronavirus vaccine: next-generation vaccine design and immune mechanisms. *Cell Mol Immunol* **21**, 103-118, doi:10.1038/s41423-023-01116-8 (2024).
- 490 Dolton, G., Rius, C., Hasan, M. S. *et al.* Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope. *Cell* **185**, 2936-2951 e2919, doi:10.1016/j.cell.2022.07.002 (2022).
- 491 Foix, A., Lopez, D., Diez-Fuertes, F., McConnell, M. J. & Martin-Galiano, A. J. Predicted impact of the viral mutational landscape on the cytotoxic response against SARS-CoV-2. *PLoS Comput Biol* **18**, e1009726, doi:10.1371/journal.pcbi.1009726 (2022).
- 492 Escalera, A., Gonzalez-Reiche, A. S., Aslam, S. *et al.* Mutations in SARS-CoV-2 variants of concern link to increased spike cleavage and virus transmission. *Cell Host Microbe* **30**, 373-387 e377, doi:10.1016/j.chom.2022.01.006 (2022).
- 493 Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y. *et al.* Membrane fusion and immune evasion by the spike protein of SARS-CoV-2 Delta variant. *Science* **374**, 1353-1360, doi:10.1126/science.abl9463 (2021).
- 494 Liu, C., Ginn, H. M., Dejnirattisai, W. *et al.* Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell* **184**, 4220-4236 e4213, doi:10.1016/j.cell.2021.06.020 (2021).
- 495 Cele, S., Jackson, L., Houry, D. S. *et al.* Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. *Nature* **602**, 654-656, doi:10.1038/s41586-021-04387-1 (2022).
- 496 Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., St Denis, K. *et al.* Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell* **184**, 2372-2383 e2379, doi:10.1016/j.cell.2021.03.013 (2021).
- 497 Choi, A., Koch, M., Wu, K. *et al.* Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 variant mRNA vaccine boosters in healthy adults: an interim analysis. *Nat Med* **27**, 2025-2031, doi:10.1038/s41591-021-01527-y (2021).
- 498 Chalkias, S., Harper, C., Vrbicky, K. *et al.* A Bivalent Omicron-Containing Booster Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* **387**, 1279-1291, doi:10.1056/NEJMoa2208343 (2022).

- 499 Chalkias, S., Eder, F., Essink, B. *et al.* Safety, immunogenicity and antibody persistence of a bivalent Beta-containing booster vaccine against COVID-19: a phase 2/3 trial. *Nat Med* **28**, 2388-2397, doi:10.1038/s41591-022-02031-7 (2022).
- 500 Branche, A. R., Roupael, N. G., Diemert, D. J. *et al.* SARS-CoV-2 Variant Vaccine Boosters Trial: Preliminary Analyses. *medRxiv*, doi:10.1101/2022.07.12.22277336 (2022).
- 501 Pulliam, J. R. C., van Schalkwyk, C., Govender, N. *et al.* Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science* **376**, eabn4947, doi:10.1126/science.abn4947 (2022).
- 502 Altarawneh, H. N., Chemaitelly, H., Hasan, M. R. *et al.* Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med* **386**, 1288-1290, doi:10.1056/NEJMc2200133 (2022).
- 503 Pilz, S., Theiler-Schwetz, V., Trummer, C., Krause, R. & Ioannidis, J. P. A. SARS-CoV-2 reinfections: Overview of efficacy and duration of natural and hybrid immunity. *Environ Res* **209**, 112911, doi:10.1016/j.envres.2022.112911 (2022).
- 504 Medic, S., Anastassopoulou, C., Lozanov-Crvenkovic, Z. *et al.* Risk and severity of SARS-CoV-2 reinfections during 2020-2022 in Vojvodina, Serbia: A population-level observational study. *Lancet Reg Health Eur* **20**, 100453, doi:10.1016/j.lanepe.2022.100453 (2022).



