



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

CRISTIANA SOARES DOS SANTOS DE MORAIS

Produção da proteína ECA2 recombinante para utilização no
desenvolvimento de anticorpos monoclonais com fins terapêuticos e
diagnósticos da COVID-19

BRASÍLIA
2022

CRISTIANA SOARES DOS SANTOS DE MORAIS

Produção da proteína ECA2 recombinante para utilização no desenvolvimento de anticorpos monoclonais com fins terapêuticos e diagnósticos da COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Dr André Moraes Nicola

BRASÍLIA
2022

Dissertação de autoria de Cristiana Soares dos Santos de Moraes, intitulada “PRODUÇÃO DA PROTEÍNA ECA2 RECOMBINANTE PARA UTILIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS COM FINS TERAPÊUTICOS E DIAGNÓSTICOS DA COVID-19”, apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular da Universidade de Brasília em 11/10/2022, sido defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. André Moraes Nicola (Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – UnB

Prof Dr. Rinaldo Wellerson Pereira (Membro interno)
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – UnB

Prof. Dr. Gustavo Felipe da Silva (Membro externo)
Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo (Suplente)
Faculdade de Ceilândia – UnB

BRASÍLIA

2022

DEDICATÓRIA

Dedico essa enorme conquista ao meu marido Bruno, que desde antes da seleção no mestrado acreditou, apoiou e me incentivou a vencer todos os obstáculos do caminho; às minhas filhas Sofia e Gabriela, que me são fonte de inspiração diária na busca por ser exemplo de força e persistência; ao meu filho Guilherme, que ainda no meu ventre me ensina que cada coisa acontece no tempo certo; e aos meus pais Norma e Edison, que desde criança me deram asas aos sonhos, permitindo-me acreditar que muito posso alcançar com esforço e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por colocar em meu caminho pessoas que são essenciais para meu crescimento pessoal e profissional e, especialmente, por ter nos guardado com saúde nesses mais de dois anos de pandemia.

Agradeço infinitamente ao meu marido, Bruno, pelo cuidado e carinho diários. Suas palavras de incentivo e seu apoio foram fundamentais nessa jornada, que por muitas vezes você acreditou ser possível quando eu mesma ainda duvidava. Obrigada por estar ao meu lado nessa ousadia de sair completamente da zona de conforto e por me motivar a crescer cada dia mais. Você bem sabe as dificuldades do caminho, mas conhece o significado desta conquista para mim. Você é incrível, amo você! Agradeço muitíssimo também às minhas filhas, Sofia e Gabriela, por toda a paciência e compreensão pela minha ausência em vários momentos que precisei ir ao laboratório aos finais de semana, por irem comigo até o NMT e me esperarem finalizar experimentos, por toda curiosidade demonstrada sobre os procedimentos de biotecnologia e cada conversa que tivemos que me fazia brilhar os olhos para explicar a vocês. Amo muito vocês! Agradeço ao meu pequeno Guilherme, que ainda a caminho me acompanhou os últimos 8 meses, já me preenchendo de muito amor e serenidade para conseguir finalizar essa etapa.

Agradeço de coração ao professor André, que me incentivou a ingressar no mestrado e me recebeu no LabMIB aceitando o desafio de orientar uma fisioterapeuta sem qualquer experiência em biologia molecular ou imunologia. A ousadia foi recíproca e sinto enorme gratidão pela confiança que você depositou em mim, desde o princípio.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que tiveram uma paciência indescritível ao me ajudar e ensinar desde o mais básico dos procedimentos. Adrielle, agradeço seu acolhimento e apoio desde antes da seleção, na elaboração do projeto e em tantos ensinamentos de cultivo celular. Verenice, faltam palavras para agradecer sua paciência a todo momento, ao me sanar dúvidas por muitas vezes básicas durante experimentos complexos, ao me iluminar as ideias nas mudanças de curso do projeto e por tantas aulas mesmo depois de vários quilômetros de distância e muitas horas de fuso horário nos separarem. Muito obrigada por ser meu exemplo de resiliência na ciência! Juan, agradeço sua parceria nos experimentos, especialmente nos últimos meses, ensinamentos e apoio em pensar novos caminhos para resultados que não eram esperados. Kaio, Nathália, Luiz, Amanda e Thaís agradeço por toda colaboração, direta ou indireta, dentro do laboratório, cada troca de informações, ensinamento e conversas de desabafo.

Aos meus pais, agradeço por serem a rede de apoio em que posso sempre confiar, em tantos momentos. A todos aqueles que de alguma forma me incentivaram e tornaram esse sonho possível, deixo aqui minha gratidão!

RESUMO

O coronavírus SARS-CoV-2, agente etiológico responsável pela pandemia de COVID-19, reconhece a Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ECA2) expressa na membrana celular como receptor para ligação à célula humana, iniciando assim a infecção viral. Até o momento não existe tratamento específico para a doença e os métodos diagnósticos disponíveis possuem custos, sensibilidades e especificidades variados. Assim, a produção de anticorpos monoclonais específicos contra o SARS-COV-2 ainda apresenta grande relevância, sendo imprescindível verificar sua capacidade neutralizante a cada nova variante emergente. Neste estudo, foi produzida ECA2 recombinante solúvel por expressão transiente em células de mamíferos HEK 293F e ExpiCHO para utilização no desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos com finalidade terapêutica e diagnóstica da COVID-19. A proteína expressa apresentou boa produtividade nas duas linhagens celulares (1,8 mg/mL e 3,4 mg/mL, respectivamente), porém com diferentes padrões de glicosilação. A ligação da proteína recombinante à proteína Spike do vírus original e das variantes Alfa e Gama foi confirmada em ensaios de ELISA e citometria de fluxo. E a utilização da proteína recombinante em ensaios de inibição da ligação à proteína viral de duas variantes, Alfa e Gama, por scFv foi validada por citometria de fluxo, com inibição superior a 90% por três diferentes anticorpos.

Palavra- chave: Expressão transiente; células de mamíferos; proteína recombinante; enzima conversora da angiotensina 2; anticorpos monoclonais; COVID-19.

ABSTRACT

Expression of recombinant Angiotensin-converting Enzyme 2 for human monoclonal antibody development aiming therapeutic and diagnostic approaches

SARS-CoV-2 is the etiologic agent of COVID-19 pandemic, which binds to cell surface receptor Angiotensin-converting Enzyme 2 (ACE2) to begin viral replication. Until the moment, there is no specific treatment for the disease and available diagnostic methods vary in costs, sensibility, and specificity. In this context, specific anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies development is still of great relevance and to test their neutralization capacity for each new variant will continue to be essential. In this study, we have transiently expressed soluble recombinant ACE2 in different mammalian cell lines HEK293F and ExpiCHO to apply in development of human monoclonal antibodies to therapeutic and diagnostic uses in COVID-19. The productivity of recombinant protein was high for both cell lines (1,8 mg/mL and 3,4 mg/mL, respectively), but they showed different glycosylation patterns. The binding capacity of the expressed protein to Spike protein of original virus and variants was confirmed in ELISA and flow cytometry. And the applicability of recombinant protein in inhibition assays with Alpha and Gama variants was validated by flow cytometry, with inhibitory capacity superior of 90% for three scFv clones.

Keywords: Transient expression; mammalian cells; recombinant protein; angiotensin-converting enzyme 2; monoclonal antibodies; COVID-19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da organização genômica do SARS-CoV-2	15
Figura 2 - Desenho representativo da estrutura homotrimérica da proteína S do SARS-CoV-2	16
Figura 3 - (B) Estrutura molecular por cristalografia do complexo da ligação da ECA2 ao RBD da proteína S do SARS-CoV-2. (C) Sobreposição das estruturas moleculares do complexo de ligação da ECA2 ao RBD da proteína S do SARS-CoV em amarelo e do SARS-CoV-2 em verde.....	17
Figura 4 - (A) Esquema da mudança conformacional do RDB durante a ligação com a ECA2 na membrana celular. (B) Tabela comparativa de características do RDB do SARS-CoV-2 com do SARS-CoV	18
Figura 5 - Desenho esquemático das mudanças conformacionais da proteína S durante a ligação ao receptor e fusão à membrana celular.....	19
Figura 6 - Esquema da humanização dos anticorpos monoclonais e seu potencial imunogênico adverso	21
Figura 7 - Ilustração das diferentes formas de apresentação dos anticorpos monoclonais	22
Figura 8 - Lista de mutações das variantes Alfa, Beta, Gama, Delta, Eta e Kappa.....	24
Figura 9 - Ligação da ECA2 às variantes virais por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)....	25
Figura 10 - Gráfico da frequência cada variante registrada em função dos meses desde o início da pandemia de COVID-19	25
Figura 11 - Estruturas moleculares por cristalografia da proteína S de variantes do SARS-CoV-2	26
Figura 12 - Quadro das mutações ocorridas na região do RBD da variante Ômicron	27
Figura 13 - Ilustração da probabilidade da detecção viral ou de anticorpos em função das semanas de infecção.....	32
Figura 14 - Mapa do vetor de expressão da ECA2 recombinante	35
Figura 15 – Fotografia da membrana de Dot Blot da ECA2 recombinante expressa em HEK 293F, detectado com anticorpo anti-Histidina conjugado a HRP	46
Figura 16 – Fotografia de gel de SDS-PAGE para verificação da pureza da ECA2 expressa em HEK293F, com linha pontilhada indicando a banda de peso molecular de 100 kDa (esquerda) e referência do peso molecular segundo o marcador ThermoScientific™ ref 26617 (direita)	46
Figura 17 – Gráfico do resultado do ELISA de ligação ECA2 à proteína Spike original de SARS-CoV-2	47
Figura 18 – Gráfico da absorvância a 450 nm da ligação da ECA2 recombinante comercial ao RBD e à proteína do SARS-COV-2 original	47
Figura 19 - Ligação da ECA2 recombinante às proteínas S das variantes Alfa e Gama.....	48
Figura 20 - Ligação dos scFv às proteínas S das variantes Alfa e Gama (A) e inibição da ligação da proteína S da variante Gama pelos scFv	49
Figura 21 - Gráfico da ligação da proteína ECA2 recombinante às proteínas S das variantes Alfa e Gama, por citometria de fluxo	50
Figura 22 - Gráfico da inibição da ligação da ECA2 recombinante à proteína S da variante Alfa por três clones de scFv	51
Figura 23 - Gráfico da inibição da ligação da ECA2 recombinante à proteína S da variante Gama por três clones de scFv	51
Figura 24 – Fotografia da membrana de Western Blot da ECA2 recombinante expressa em ExpiCHO e HEK 293F.....	52
Figura 25 – Gráfico do ELISA de ligação da proteína ECA2 recombinante ao RBD da proteína Spike original.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MÉTODOS	35
4.1	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	35
4.1.1	Preparo do Vetor de Expressão	35
4.1.2	Preparo das Células de Mamíferos para Transfecção	36
4.1.3	Transfecção das Células de Mamíferos	37
4.1.4	Expressão Transiente da Proteína Recombinante	37
4.1.5	Purificação da Proteína Recombinante por Cromatografia de Afinidade	38
4.1.6	Dot Blot	38
4.1.7	SDS-PAGE	39
4.1.8	Conjugação da Proteína Recombinante à Biotina	39
4.2	ENSAIOS DE LIGAÇÃO À PROTEÍNA VIRAL	40
4.2.1	ELISA	40
4.2.2	Citometria de Fluxo	40
4.3	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO À PROTEÍNA VIRAL	41
4.3.1	Citometria de Fluxo	41
4.4	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	42
4.4.1	Preparo das Células de Mamíferos para Transfecção	42
4.4.2	Transfecção das Células de Mamíferos	43
4.4.3	Expressão Transiente da Proteína Recombinante	44
4.4.4	Purificação da Proteína Recombinante por Cromatografia de Afinidade	44
4.4.5	Western Blot	45
4.4.6	Conjugação da Proteína Recombinante à Biotina	45
4.4.7	Análise Dos Dados	45
5	RESULTADOS	46
5.1	EXPRESSÃO TRANSIENTE E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ECA2 RECOMBINANTE.....	46
5.2	ELISA DE LIGAÇÃO DA ECA2 RECOMBINANTE À PROTEÍNA SPIKE ORIGINAL 47	
5.3	CITOMETRIA DE FLUXO.....	48

5.4	EXPRESSÃO DA ECA2 RECOMBINANTE EM DIFERENTES CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, surgiu em Wuhan, na China, uma nova doença com sintomas inicialmente respiratórios, que podiam progredir rapidamente para um quadro de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS). Pesquisadores locais isolaram o agente infeccioso e o identificaram como pertencente ao grupo dos coronavírus (ZHOU *et al.*, 2020). A similaridade com o Coronavírus causador de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), responsável por um surto em 2002, foi determinante para que o novo vírus fosse posteriormente denominado SARS-CoV-2 e a doença causada, Coronavirus Disease-2019 (COVID-19).

A doença viral se espalhou rapidamente por diversos países com um número espantoso de casos e óbitos, sendo decretada pandemia pela Organização Mundial de Saúde em 11 de março de 2020. Devido à enorme sobrecarga dos serviços de saúde e a progressão alarmante do número de casos e mortes, medidas sanitárias foram adotadas na tentativa de minimizar o contágio. Vários países fecharam suas fronteiras e seus comércios, sendo a circulação de pessoas foi restrita nas cidades. Desta forma, surgiram mundialmente prejuízos na saúde, econômicos e sociais sem precedentes, tornando a pandemia de COVID-19 grande foco dos estudos científicos para busca de métodos eficazes de diagnóstico, prevenção e tratamento da doença.

Cientistas do mundo inteiro direcionaram seus estudos para formas de controlar o avanço da COVID-19, bem como vacinas e tratamentos (DUAN *et al.*, 2020). Diante do cenário mundial, diversos centros de pesquisas nacionais também se dedicaram a busca por métodos de prevenção, de diagnóstico e de terapia da doença. Na Universidade de Brasília, por medidas de segurança sanitárias, a circulação de pessoas também foi restrita e somente projetos relacionados à COVID-19 puderam continuar, ainda com limite de pesquisadores dentro dos laboratórios. O Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia (LabMIB), sob a coordenação do professor André Moraes Nicola, devido à sua expertise na área de anticorpos monoclonais, também direcionou seus trabalhos em resposta às demandas mundiais por estudos para o desenvolvimento de tecnologias relacionadas a COVID-19.

Neste contexto, o LabMIB, junto com outras instituições de Brasília, como a Fundação Hemocentro, o Hospital Universitário de Brasília (HUB) e o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) - nomeado hospital de referência para o tratamento de pessoas com COVID-19, iniciou o Projeto de Pesquisa intitulado “Anticorpos na terapia da COVID-19: estudo clínico de fase IIa com plasma de convalescentes e geração de anticorpos monoclonais humanos” em

abril de 2020 (registro na plataforma Brasil CAAE 30931820.3.0000.5558), ao qual nesta dissertação será referido como amplo Projeto. Foi neste momento que o professor André Nicola, sabendo do meu interesse em colaborar com as pesquisas em Imunologia, convidou-me a unir esforços ao grupo. Inicialmente, como pesquisadora voluntária, participei da aplicação dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e seleção de doadores de plasma convalescentes, juntamente com a enfermeira Ana Catarina Vasconcelos, da Agência Transfusional do HUB e com a farmacêutica Adrielle Veloso, aluna de doutorado do Programa de Patologia Molecular. Em agosto de 2020, participei do processo de seleção para o mestrado no Programa de Patologia Molecular, com o projeto intitulado “Correlação entre os títulos de anticorpos no soro de doadores e os desfechos clínicos do uso terapêutico de plasma convalescente na COVID-19”, sob a orientação do professor André Nicola.

Diversos desafios foram enfrentados desde o início do Projeto. O número restrito de pessoas nos laboratórios, as dificuldades logísticas para compra e entrega de materiais ou reagentes, o pouco conhecimento do vírus e seus mecanismos patogênicos, o que gerou inúmeros estudos com descobertas e publicações científicas em uma velocidade sem precedentes, são alguns exemplos. Além disso, a dificuldade do diagnóstico precoce da doença era um grande limitador para a captação de voluntários receptores do plasma de convalescentes dentro da janela terapêutica proposta no Projeto. Este fator contribuiu para uma inclusão um pouco mais lenta de indivíduos no grupo tratamento, apesar de uma razoável captação de doadores. No decorrer dos meses, o estudo foi incluído em um consórcio internacional de estudos com plasma de convalescentes (COMPILE) e a análise interina dos dados conjuntos mostrou pouco benefício do uso do plasma de convalescentes conforme desenhado no Projeto inicial, levando à suspensão das aplicações do plasma. A segunda etapa do Projeto, a qual envolve a geração de anticorpos monoclonais humanos, então seguiu seu desenvolvimento com os trabalhos da pesquisadora visitante Verenice Paredes, o aluno de doutorado Juan Fernando Fiasco, a aluna de doutorado Adrielle Veloso, o pesquisador Kaio César Gorgonha, a aluna de mestrado Nathália Freitas, os então alunos de Iniciação Científica Alessandra Pérez e Luiz Stenzel, e eu.

Assim, tais desafios forçaram a adaptação do meu projeto de Pós-Graduação à nova realidade. Então o estudo aqui apresentado faz parte do amplo Projeto conduzido no LabMIB, coordenado pelo professor André Nicola.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A COVID-19 inicialmente era conhecida como uma doença respiratória, que em sua evolução para quadros graves resultava em Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*). Com o passar dos meses, novos sintomas foram identificados como relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2. As características clínicas variam desde indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos, indivíduos com sintomas moderados como cefaleias, mialgias, fadiga, febre, tosse seca, até casos mais graves evoluindo com insuficiência respiratória, lesão miocárdica aguda, lesões do sistema nervoso central e periférico, disfunções vasculares e de coagulação, podendo levar à morte por falência orgânica resultante de uma resposta imune exacerbada (WIERSINGA *et al.*, 2020). A variedade dos sintomas vivenciados está relacionada a condições individuais como sexo, idade e comorbidades, bem como à carga viral adquirida pelo indivíduo. Casos graves podem alcançar uma carga viral 60 vezes maior que casos moderados (ROTONDO *et al.*, 2021-).

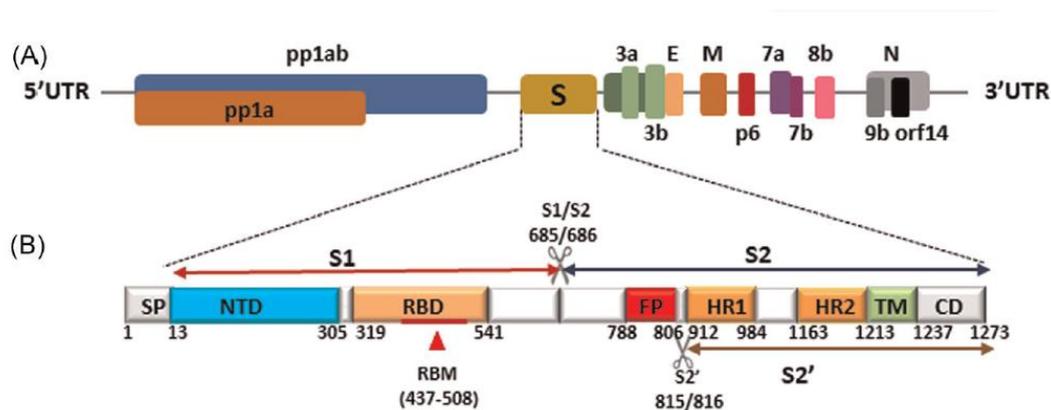
A transmissão do vírus ocorre por meio de gotículas de saliva de indivíduos sintomáticos (WIERSINGA *et al.*, 2020). A transmissão por indivíduos assintomáticos ou durante o período de incubação da doença, bem como por tocar superfícies contaminadas e depois tocar olhos, nariz ou boca também é apontada como possível (ROTONDO *et al.*, 2022). Desta forma o uso de máscaras e medidas de higiene sanitária foram orientadas e incentivadas como forma de controle da propagação da doença (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>).

Estudos genéticos do SARS-CoV-2 mostraram que este pertence ao gênero dos β -coronavírus, subgênero *Sabercovirus*. Assim como os demais coronavírus, é envelopado e possui material genético organizado em uma fita simples de RNA, sentido positivo, com comprimento entre 26 a 33 kbs (ZHU *et al.*, 2021). Os coronavírus possuem o maior material genético dentre os vírus de RNA e possuem uma cauda de poliadenosina com cerca de 30 nucleotídeos (HATMAL *et al.*, 2020; SALLEH; DERRICK; DERIS, 2021).

O SARS-CoV-2 possui 80% de similaridade genética com os demais coronavírus humanos. O RatG13, apesar de ser encontrado em morcegos, é o coronavírus mais próximo, com 93,1% de similaridade gênica (HATMAL *et al.*, 2020). O genoma do SARS-CoV-2 possui aproximadamente 29,7kbs (ZHU *et al.*, 2021) e 14 Regiões Abertas de Leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que codificam 27 proteínas, sendo 4 estruturais. Conforme esquematizado na Figura 1, na extremidade 5', há a ORF1ab e a ORF 1a, as quais codificam proteínas não estruturais. Já na extremidade 3', há os genes que codificam as 4 proteínas

estruturais: Envelope (E), Membrana (M), Nucleoapsídeo (N) e Spike (S) e mais 8 proteínas acessórias (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b e ORF14) (HATMAL *et al.*, 2020). As proteínas E, M, N e S são responsáveis pela estrutura externa do vírus, sendo a proteína S, que confere a característica aparência de coroa dos coronavírus, responsável pela ligação do vírus à célula humana. Composta por 1.273 aminoácidos e aproximadamente 128kDa (KUMAWAT *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021), a proteína S do SARS-CoV-2 possui aproximadamente 76% de similaridade de aminoácidos com a proteína S do SARS-CoV (HOFFMANN *et al.*, 2020) e 98%, com a proteína S do RatG13 (WRAPP *et al.*, 2020). Apesar de grande similaridade entre o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, algumas mutações de aminoácidos, especialmente na proteína S e RBD, como a inserção de “RRAR” no sítio de clivagem em S1/S2 por furina (KUMAWAT *et al.*, 2022) conferem diferenças na estrutura terciária e na funcionalidade da proteína (CHEN *et al.*, 2021; HATMAL *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2020; WRAPP *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2021).

Figura 1 - Esquema da organização genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2021)

Semelhante ao SARS-CoV (KUHN *et al.*, 2004), o SARS-CoV-2 inicia sua infecção celular pela interação da proteína S ao receptor de membrana celular, a Enzima de Conversão da Angiotensina 2 (ECA2) (HOFFMANN *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020), uma metaloprotease de zinco transmembrana tipo I expressa em diversos tipos celulares humanos, dentre eles, células epiteliais e pneumócitos do tipo II (KUMAWAT *et al.*, 2022; SHANG *et al.*, 2020). A ECA2 pode ser clivada em sua porção extracelular originando a ECA2 solúvel a qual é liberada para circulação sanguínea (SCIALO *et al.*, 2020). A forma solúvel da ECA2 é

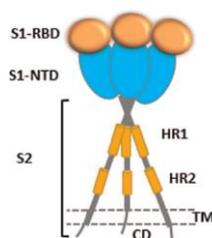
uma proteína dimérica que possui massa molecular de 85kDa e, por ser densamente glicosilada, atinge massa molecular de aproximadamente 110kDa (KUHN *et al.*, 2004).

O estudo estrutural da proteína S mostrou que esta é uma glicoproteína homotrimérica, conforme visto na Figura 2, composta por duas subunidades S1 e S2, as quais se ligam de forma não-covalente em um estado metaestável antes da interação com o receptor celular e desempenham diferentes funções na patogênese (HATMAL *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2021). A região S1 é responsável pela ligação do vírus ao receptor celular e a região S2, pela fusão das membranas viral e celular (SHANG *et al.*, 2020). Após a ligação de S1 ao receptor, o sítio S1/S2 é clivado por uma protease do hospedeiro (a furina ou a enzima transmembrana serina protease 2 - TMPRSS2) (HOFFMANN *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2020) o que permite uma modificação tridimensional da região S2 passando para uma conformação mais estável, ocorrendo a fusão das membranas viral e celular (WRAPP *et al.*, 2020). Após a fusão das membranas, o material genético do SARS-CoV-2 é transportado para dentro da célula iniciando o processo de replicação viral (HATMAL *et al.*, 2020).

Apesar de haver grande de similaridade entre os aminoácidos do SARS-CoV e do SARS-CoV-2, a subunidade S1 do SARS-CoV-2 possui divergências, mantendo apenas 63,3% de identidade, enquanto a subunidade S2 apresenta-se mais preservada, mantendo 90% de similaridade dos aminoácidos (ZHU *et al.*, 2021). A inserção de “RRAR” no sítio de clivagem por furina da região S1/S2 foi demonstrado ser importante para aumentar a virulência do SARS-CoV-2 comparado aos demais β -coronavírus (HATMAL *et al.*, 2020; KUMAWAT *et al.*, 2022).

A subunidade S1 é composta por duas regiões, o Domínio N-terminal (NTD) e o domínio C-terminal (CTD), ambos responsáveis pelo processo de ligação ao receptor, por meio do Domínio de Ligação ao Receptor (RBD). O RBD é uma importante região do CTD, a qual engloba a região do Motivo de Ligação ao Receptor (RBM) onde está localizada a maioria dos resíduos de ligação da proteína S e o receptor ECA2 celular (ZHU *et al.*, 2021).

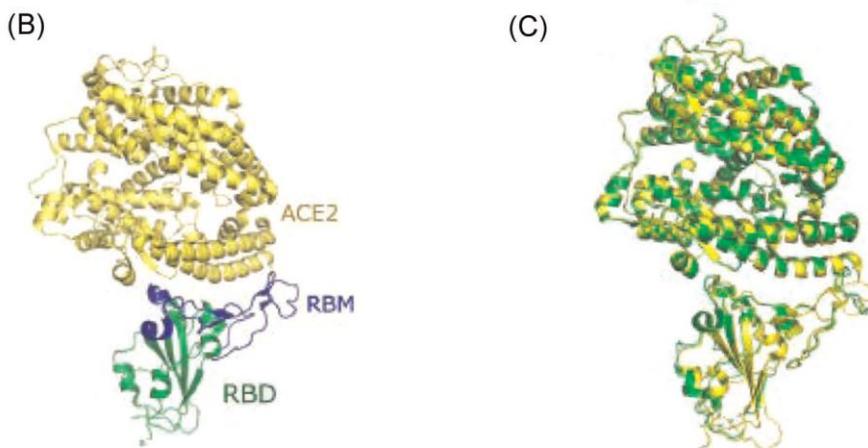
Figura 2 - Desenho representativo da estrutura homotrimérica da proteína S do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2021)

O modelo estrutural do RBD do SARS-CoV-2 e da ligação RBD-ECA2 mostrou grande similaridade ao SARS-CoV (Figura 3) com preservação dos resíduos principais para a ligação ao receptor. Porém, seis resíduos mostraram ser importantes para o reconhecimento e ligação ao receptor, sendo cinco deles diferentes entre o SARS-CoV e o SARS-CoV-2 (L455, F486, Q493, S494, N501, Y505), todos eles favorecendo a interação do vírus com a ECA2 (ZHU *et al.*, 2021). A afinidade de ligação do RBD à ECA2 é um ponto crucial para a infectividade do vírus e, em estudos com Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), Shang *et al.* (2020) e Wrapp *et al.* (2020) relataram que o SARS-CoV-2 apresenta afinidade de ligação de 10 a 20 vezes maior ao receptor quando comparado ao SARS-CoV.

Figura 3 - (B) Estrutura molecular por cristalografia do complexo da ligação da ECA2 ao RBD da proteína S do SARS-CoV-2. (C) Sobreposição das estruturas moleculares do complexo de ligação da ECA2 ao RBD da proteína S do SARS-CoV em amarelo e do SARS-CoV-2 em verde



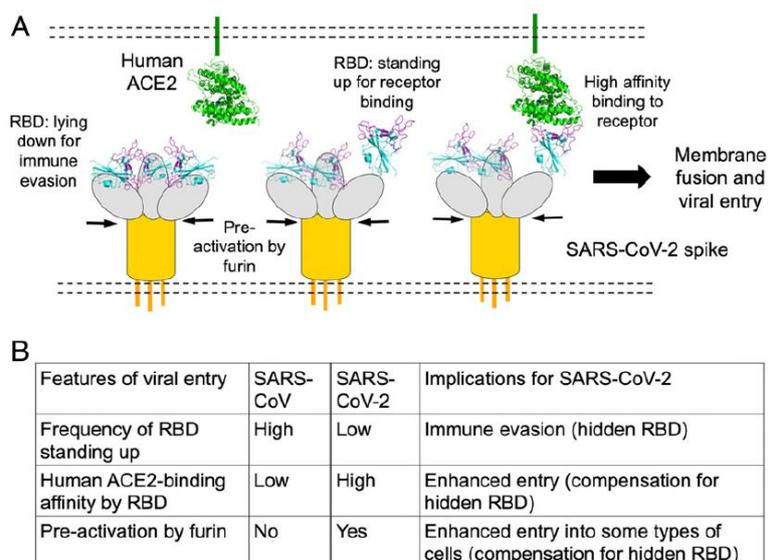
Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2021)

Algumas diferenças no RBD do SARS-CoV-2 podem explicar tal alteração funcional. Dois resíduos na ECA2 já foram demonstrados serem importantes para a estabilização da ligação ao vírus (Lys31 e Lys353). O estudo do SARS-CoV-2 original mostrou que ele evoluiu de forma a estabilizar a ligação a esses aminoácidos com Gln493 e Leu455 para a Lys31 e Asn501 para a Lys353. Sendo assim, tais aminoácidos podem ter papel importante no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas. Além disso, o SARS-CoV-2 possui estrutura mais compacta da região de ligação com a ECA2, tornando-a mais estável (ZHU *et al.*, 2021).

Wrapp *et al.* (2020), utilizando criomicroscopia eletrônica em nível atômico do SARS-CoV-2, mostraram que este, assim como o SARS-CoV, possui ao menos duas conformações tridimensionais da proteína S antes da fusão celular. Uma conformação aberta expõe um ou

mais RBD e os torna acessíveis ao receptor e outra, fechada, com os três RBD voltados para o centro do trímero, tornando-os inacessíveis ao receptor (KUMAWAT *et al.*, 2022). Tais conformações parecem impactar não apenas a afinidade de ligação ao receptor, mas também a imunogenicidade do vírus, podendo ser a conformação fechada uma estratégia de escape imune (Figura 4). Estudos verificaram que o SARS-CoV-2 apresenta a conformação aberta com menor frequência que o SAR-CoV (SHANG *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020; WRAPP *et al.*, 2020). Além disso, alguns estudos relataram uma terceira conformação da proteína S, sendo ela a “trancada”. Nessa conformação, favorecida por meios ácidos, a proteína S adota conformação tridimensional compacta, estabilizada por ligações de ponte dissulfeto, impedindo a exposição do RBD, o qual fica totalmente inacessível ao receptor (QU *et al.*, 2022).

Figura 4 - (A) Esquema da mudança conformacional do RBD durante a ligação com a ECA2 na membrana celular. (B) Tabela comparativa de características do RBD do SARS-CoV-2 com do SARS-CoV



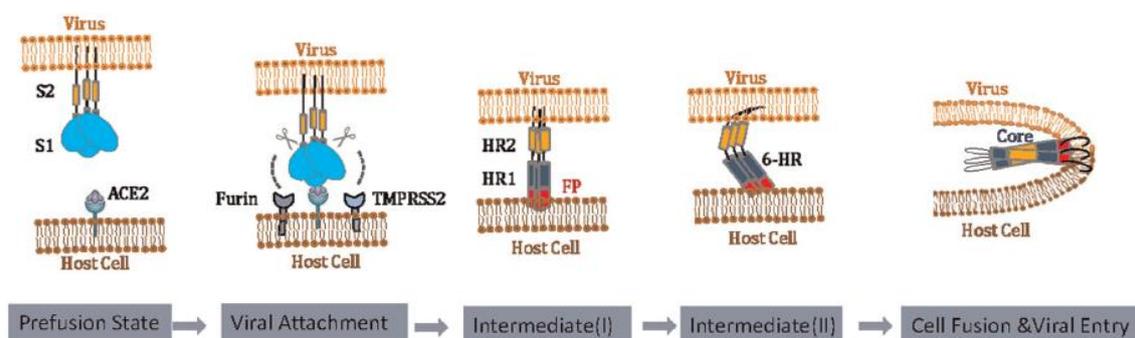
Fonte: Adaptado de Shang *et al.* (2020)

Após a ligação da proteína S à ECA2 celular, ocorre a clivagem do sítio S1/S2 pela furina ou pela TMPRSS2, e a proteína S adquire conformação mais estável, expondo a subunidade S2, responsável pela fusão do vírus à célula. Esta subunidade é composta pelo peptídeo de fusão (FP), pelo sítio de clivagem S2', por dois domínios de repetição heptal (HR1/HR2), por um domínio transmembrana (TM) e por um domínio citoplasmático (CD). Grande similaridade de aminoácidos entre o SARS-CoV e o SARS-CoV-2 foi observada nessa

subunidade, sendo as poucas divergências favoráveis à patogenicidade do SARS-CoV-2 (ZHU *et al.*, 2021).

Conforme esquematizado na Figura 5, após a clivagem no sítio S2', o FP, um peptídeo de natureza hidrofóbica, é exposto para se inserir na membrana da célula hospedeira iniciando o processo de fusão celular. Os domínios HR1 e HR2, chamados de região central de fusão, então interagem de forma a gerar um complexo trimérico que facilita a ligação do FP à membrana celular e forma uma ponte para aproximar o TM, o qual ancora a proteína S ao envelope viral, da célula hospedeira. O TM interage com o FP, promovendo a fusão celular e formando o poro de fusão, por fim transferindo o material genético viral à célula. Na região C-terminal da subunidade S2 há o CD, uma pequena porção intracelular do peptídeo, a qual é relacionada à produção viral, transporte intracelular e fusão célula-célula (ZHU *et al.*, 2021).

Figura 5 - Desenho esquemático das mudanças conformacionais da proteína S durante a ligação ao receptor e fusão à membrana celular



Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* (2021)

À medida que os mecanismos de infecção viral e patogênese foram sendo desvendados, pesquisadores se concentraram na busca por diferentes formas de inibição da interação do vírus com a célula humana e da progressão da doença. Diversas pesquisas com o uso de anticorpos foram e continuam a ser desenvolvidas, desde o uso de plasma convalescente e reação cruzada com anticorpos neutralizantes de outros vírus como o SARS-CoV (TAI *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020), até a produção e engenharia de anticorpos monoclonais (mAb) para SARS-CoV-2 (LIU *et al.*, 2020).

Historicamente, o primeiro relato do uso de anticorpos para tratamento de doenças infecciosas data de 1890, quando von Behring e Kitasato utilizaram soroterapia para tratamento de tétano e difteria, sendo desenvolvida antitoxina de difteria, quatro anos depois (CORTI *et al.*, 2021).

Desde o início da pandemia de COVID-19, o uso de plasma de convalescente foi considerado como estratégia para mitigar o avanço de casos e, possivelmente, a progressão para quadro graves (RAZUMIKHIN *et al.*, 2022). Assim, diversos centros de pesquisa iniciaram estudos clínicos para verificar a eficiência e segurança do seu uso na COVID-19 (DUAN *et al.*, 2020; JOYNER *et al.*, 2020; SENEFELD *et al.*, 2021), visto ser esta uma doença infecciosa com grande potencial inflamatório, associado aos casos críticos resultantes de resposta imune exacerbada.

O uso de plasma de convalescentes, também chamado de terapia passiva com anticorpos, consiste na transfusão de plasma coletado após a resolução da doença de indivíduos previamente infectados com determinado agente infeccioso, com o objetivo da transferência de anticorpos produzidos contra aquele antígeno. A transfusão de plasma de convalescente pode ser estratégia útil em situações de surtos de doenças infecciosas, quando não há tempo para o desenvolvimento de outras terapias como Imunoglobulina Hiperimune ou fármacos e anticorpos monoclonais. Historicamente, plasma de convalescentes foi utilizado em diversas doenças como caxumba, raiva, poliomielite, catapora (BLOCH *et al.*, 2020), e mais recentemente em surtos de doenças virais como Ebola, SARS-CoV (2003), Influenza A (2009) e Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012, com resultados positivos tanto em parâmetros laboratoriais e como clínicos (BLOCH *et al.*, 2020; MAIR-JENKINS *et al.*, 2015).

Na terapia passiva com anticorpos, o mecanismo de ação é pela ação direta de neutralização do vírus pelos anticorpos, ou por ações indiretas como a ação citotóxica mediada por anticorpos (ADCC, do inglês *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*), a ativação do sistema complemento, a fagocitose mediada por anticorpos (BLOCH *et al.*, 2020). Os anticorpos neutralizantes são aqueles capazes de se ligar ao vírus e impedir sua interação com o receptor, por fim impossibilitando a replicação e a propagação viral, logo, a progressão da doença. Apesar de a ação do plasma de convalescente não ser exclusiva por ação de anticorpos neutralizantes, estudos mostraram correlação entre os títulos de IgG contra o SARS-CoV-2 e a capacidade de neutralização do vírus (ROBBIANI *et al.*, 2020; WANG, Y. *et al.*, 2020). Assim, o FDA recomendou uso de plasmas de convalescentes com títulos de IgG maiores que 1:160 (LARKEY *et al.*, 2022). A vantagem da terapia passiva de anticorpos é sua disponibilidade quase imediata em situações de epidemias, ou como no contexto atual uma pandemia, visto o plasma de convalescentes precisar de pouco processamento se comparado a outros produtos imunoterapêuticos, como a Imunoglobulina Hiperimune e os anticorpos monoclonais (MAIR-JENKINS *et al.*, 2015). A principal desvantagem é a ação por um curto período, devido à

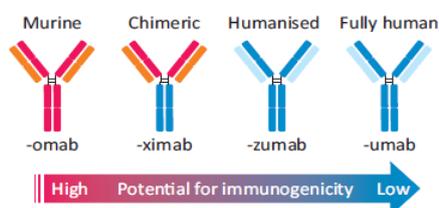
degradação natural dos anticorpos após cerca de 21 dias, não conferindo imunidade prolongada aos indivíduos tratados (SHEPARD *et al.*, 2017). Em recente revisão sistemática e meta-análise de 32 estudos clínicos randomizados e controlados, totalizando 21.478 indivíduos, Qian *et al.* (2022) concluíram não haver efeito positivo sobre os desfechos redução da mortalidade no dia 28 e resolução dos sintomas com uso de plasma de convalescentes em pacientes de COVID-19.

Já os anticorpos monoclonais (mAb) são definidos como os anticorpos produzidos por um único clone de linfócito B, após este ser sensibilizado por determinado antígeno. Assim, os mAb são anticorpos específicos, de alta afinidade e com maior capacidade de neutralização do antígeno comparado ao soro policlonal (CORTI *et al.*, 2021). A origem da tecnologia de desenvolvimento dos mAb data de 1975, quando o biólogo alemão Georges Köhler e o bioquímico argentino Cesar Milstein conseguiram isolar anticorpos monoclonais produzidos em hibridomas, uma linhagem celular imortalizada desenvolvida a partir da fusão de células de mieloma e linfócitos B, em camundongos. A descoberta foi publicada na revista Nature e rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina a Köhler, Milstein e o médico dinamarquês Niels Kaj Jerne, em 1984. O primeiro mAb com finalidade terapêutica foi o OKT3, lançado pela empresa Ortho Biotech ainda em 1984. Em 1986, o OKT3 foi aprovado para uso pelo FDA e renomeado muronomab-CD3 (YAMADA, 2011).

Os primeiros anticorpos monoclonais produzidos eram de origem murina o que resultava em efeitos imunogênicos indesejados. Buscando minimizar tais efeitos, pesquisadores desenvolveram nos anos seguintes técnicas para humanizar cada vez mais os mAb, passando pela produção de anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, até enfim desenvolverem anticorpos totalmente humanos (

Figura 6). Em 2006, foi lançado no mercado o Vectibix™, uma Imunoglobulina G subclasse 2 (IgG2), o primeiro mAb totalmente humano produzido em camundongos transgênicos (YAMADA, 2011).

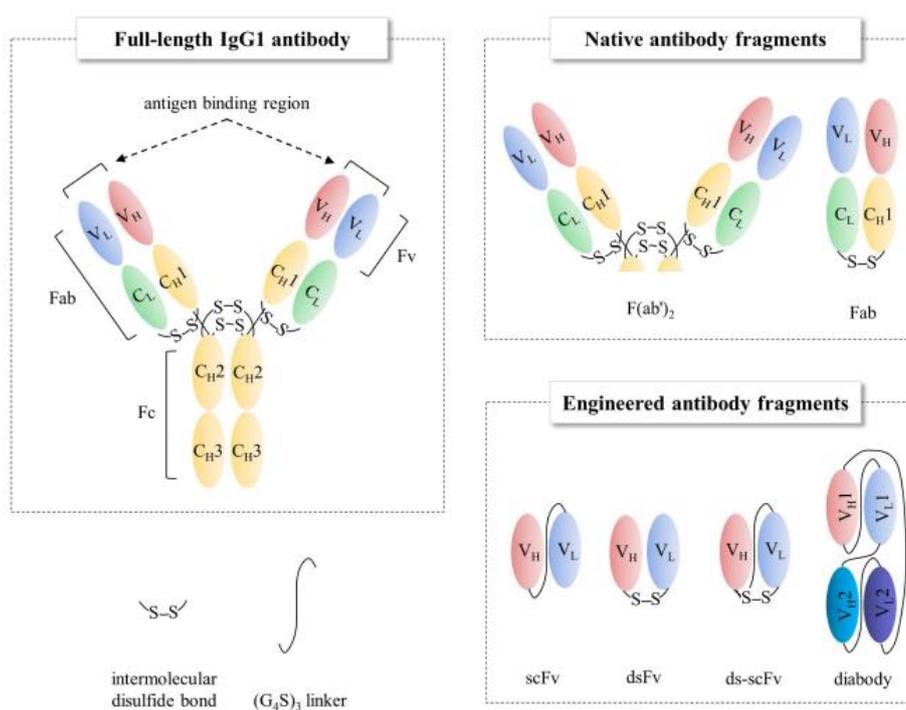
Figura 6 - Esquema da humanização dos anticorpos monoclonais e seu potencial imunogênico adverso



Fonte: Adaptado de Sherpard *et al.* (2017)

Os anticorpos monoclonais lideram os biofármacos produzidos pela indústria farmacêutica gerando diversas pesquisas para seu desenvolvimento. Uma das desvantagens dos anticorpos monoclonais humanos é o alto custo do processo produtivo. Assim, alternativas para reduzir os custos de produção são constante foco de pesquisa e desenvolvimento. Com o objetivo de minimizar os custos e aumentar a produtividade, foram desenvolvidos fragmentos de anticorpos como opção aos anticorpos completos produzido, mais comumente a imunoglobulina G subclasse 1 (IgG1) (KANG; SEONG, 2020). Exemplos de alternativas desenvolvidas são os fragmentos de ligação do antígeno (Fab) e os fragmentos variáveis de cadeia única - scFv (Figura 7).

Figura 7 - Ilustração das diferentes formas de apresentação dos anticorpos monoclonais



Fonte: Adaptado de Kang e Seong (2020)

O uso de anticorpos monoclonais também foi considerado uma opção terapêutica promissora para a COVID-19, inicialmente sendo estudados os mAb já aprovados para uso terapêutico, especialmente os desenvolvidos contra o SARS-CoV a partir de 2003 (TAI *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020). Porém, apesar de razoável similaridade genômica entre os coronavírus, o SARS-CoV-2 apresentava escape à maioria dos anticorpos monoclonais

testados. Em maio de 2020, Wang *et al.* (2020a) publicaram a descoberta de um anticorpo monoclonal humano anti-SARS-CoV com capacidade neutralizante do SARS-CoV-2, o 47D11. Em julho de 2020, outro anticorpo monoclonal humano contra o SARS-CoV, o mAb S309, foi identificado como neutralizante do vírus SARS-CoV-2 (PINTO *et al.*, 2020). Outros anticorpos neutralizantes com reação cruzada entre os coronavírus foram identificados (JIANG *et al.*, 2021) e outros estudos apontaram também promissores anticorpos neutralizantes isolados de pacientes que haviam se recuperado da infecção pelo SARS-CoV-2 (JU *et al.*, 2020; ZOST, S.J. *et al.*, 2020; ZOST, Seth J. *et al.*, 2020). Assim, ensaios clínicos com o uso dos anticorpos monoclonais em pacientes de COVID-19 começaram em diversos países (CORTI *et al.*, 2021). Atualmente sete mAb estão aprovados para uso na COVID-19 em países como Estados Unidos da América (EUA), Japão, China, Reino Unido, Austrália, além de países da União Europeia, e diversos outros estão em fases de teste. ([COVID-19 Biologics Tracker - The Antibody Society](#)). No Brasil, dois mAb possuem autorização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso em casos de COVID-19 (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>).

Apesar do avanço científico e de desenvolvimento de vacinas em tempo recorde, um novo desafio surgiu com a evolução do vírus a partir de mutações gênicas não homônimas, isto é, com alteração de aminoácidos de sua sequência peptídica. Tais mutações ocorreram em uma velocidade considerada não alarmante e em sua maioria deletérias ao vírus ou neutras. Estudos de predição mostraram que cerca de 8% das possíveis mutações de um único aminoácido do RBD são favoráveis ao vírus (STARR *et al.*, 2020). Porém algumas mutações foram capazes de alterar a proteína S, especialmente em sua região de RBD, gerando repercussões tanto na expressão do RBD como em sua ligação ao receptor, assim modificando a interação patógeno-hospedeiro e podendo resultar no escape viral de anticorpos antes neutralizantes, tanto do plasma de convalescentes como anticorpos monoclonais, além de poderem diminuir a eficácia das vacinas já desenvolvidas (WANG *et al.*, 2021). A OMS juntamente com diversos órgãos de pesquisa e saúde, bem como autoridades de países de todo o mundo faz o monitoramento do SARS-CoV-2 desde janeiro de 2020, e com o surgimento de variantes passaram, então, a monitorar as Variantes de Interesse e as Variantes Preocupantes (VOC, do inglês *Variants of Concern*), assim classificadas as que possuem maior afinidade ao receptor celular ou maior transmissibilidade .

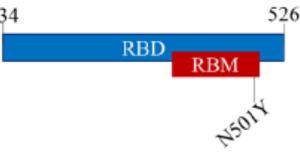
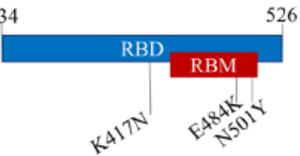
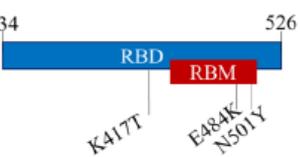
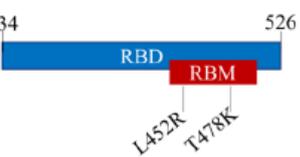
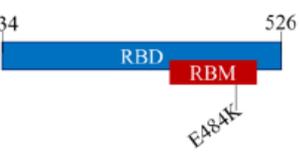
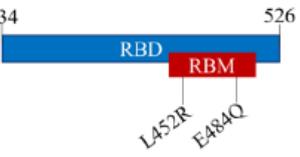
A primeira VOC foi identificada no Reino Unido, em setembro de 2020, denominada Alfa pela OMS. A variante foi classificada na linhagem PANGO como foi B.1.1.7 (https://cov-lineages.org/lineage_list.html). Estudos mostraram que a variante Alfa possui apenas uma

mutação no RBD, N501Y. Ainda no mês de setembro de 2020 uma nova VOC foi declarada pela OMS, sendo nomeada então Beta (B.1.351 da linhagem PANGO), identificada pela primeira vez em maio de 2020 na África do Sul. O sequenciamento genético da variante apontou três mutações na região do RDB, sendo elas K417N, E484K e N501Y (Figura 8) A terceira VOC, Gama, (P.1 na linhagem PANGO), foi identificada pela primeira vez em novembro de 2020, no Brasil. Esta variante também possui três mutações no RBD, K417T, E484K e N501Y, muito semelhantes às mutações da variante Beta, com a diferença de uma Treonina no sítio 417, ao invés de uma Asparagina (WOZNEY *et al.*, 2022).

Figura 8 - Lista de mutações das variantes Alfa, Beta, Gama, Delta, Eta e Kappa

Evolution of Stronger SARS-CoV-2 Variants as Revealed Through the Lens of Molecular Dynamics...

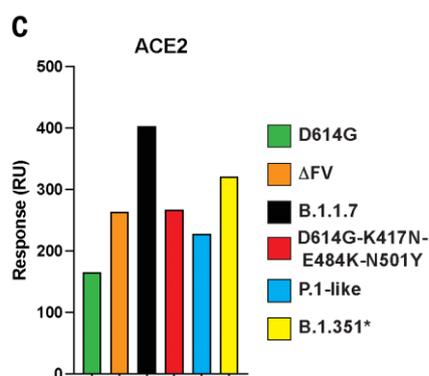
Table 1 List of residues mutated in alpha, beta, gamma, delta, eta, and kappa variants. [31]

Protein systems	Variant name (pango-lineage)	Missense mutations	Location
Alpha	B.1.1.7	N501Y	334  526
Beta	B.1.351	K417N, E484K, N501Y	334  526
Gamma	P.1	K417T, E484K, N501Y	334  526
Delta	B.1.617.2	L452R, T478K	334  526
Eta	B.1.525	E484K	334  526
Kappa	B.1.617.1	L452R, E484Q	334  526

Fonte: Adaptado de Wozney *et al.* (2022)

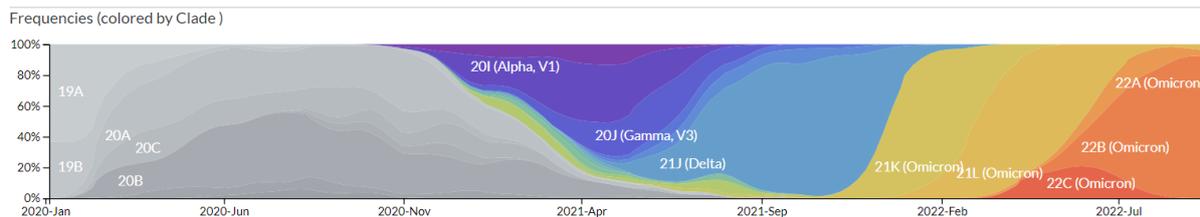
Starr *et al.* (2020) realizaram amplo estudo experimental, com mapeamento de 3.804 das 3.819 possíveis mutações únicas de aminoácidos do RDB e a relação de cada uma delas com aumento de afinidade na ligação ao receptor ou com a expressão do RBD. Dentre as observadas nas VOC, as mutações N501Y e E484K estão relacionadas ao aumento da afinidade de ligação do vírus ao receptor, sem alterar a expressão do RBD. Enquanto as mutações K417N ou K417T foram neutras quanto à afinidade de ligação e impactaram positivamente a expressão do RBD. Quando avaliadas em conjunto, por mecânica molecular de área de superfície generalizada Born (MM-GBSA) e por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) (Figura 9), as três mutações das variantes Beta e Gama apresentaram aumento de afinidade ao receptor ECA2 quando comparadas ao SARS-COV-2 original (CHEN *et al.*, 2021; GOBEIL *et al.*, 2021). Todavia, em outros estudos computacionais com simulações de dinâmica molecular (WOZNEY *et al.*, 2022) e mecânica molecular de área de superfície Poisson-Boltzman (MM-PBSA) (BURATTO *et al.*, 2021), os autores verificaram redução da afinidade de ligação das variantes Beta e Gama, quando comparadas ao vírus original. Apesar de resultados divergentes nos estudos com diferentes métodos, o monitoramento genômico dos vírus circulantes mostrou que logo as variantes se espalharam por todo o mundo e se tornaram mais prevalente que o SARS-CoV-2 original, sugerindo maior transmissibilidade (Figura 10).

Figura 9 - Ligação da ECA2 às variantes virais por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)



Fonte: Adaptado de Gobeil *et al.* (2021)

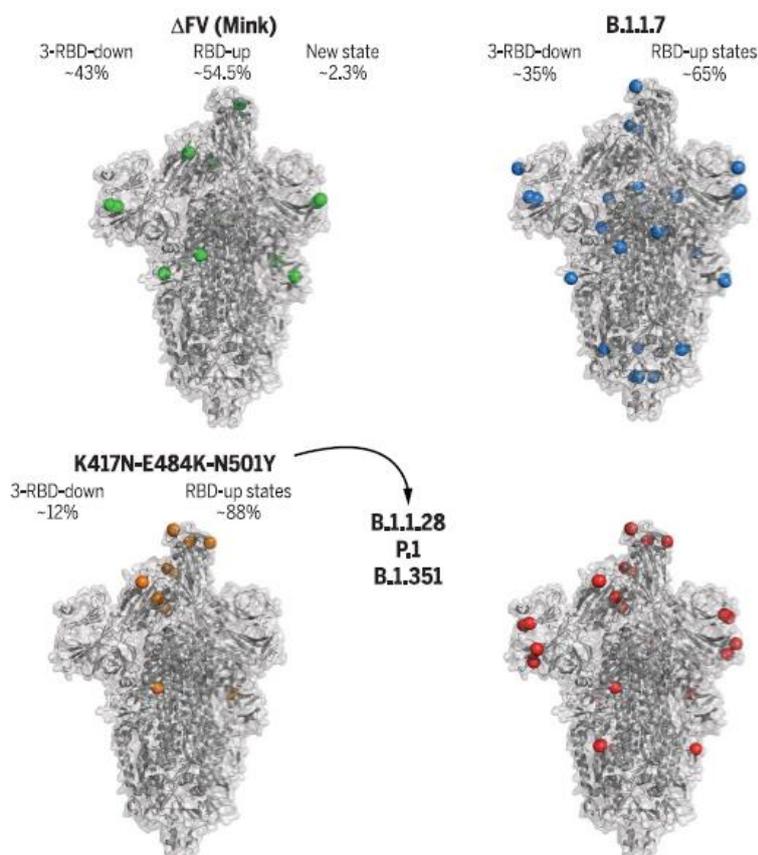
Figura 10 - Gráfico da frequência cada variante registrada em função dos meses desde o início da pandemia de COVID-19



Fonte: Disponível em: <https://nextstrain.org/ncov/open/global/all-time> Acesso em: 19 set. 2022

Além disso, Gobeil *et al.* (2021) estudaram a estrutura da proteína S das VOC Alfa, Beta e Gama por criomicroscopia eletrônica e observaram que as duas últimas adotavam a conformação do RDB aberto em 88% das capturas, em contraste com a variante Alfa que mantinha o RDB exposto em apenas 65% dos registros. Esta diferença pode resultar em maior capacidade de ligação ao receptor (Figura 11).

Figura 11 - Estruturas moleculares por cristalografia da proteína S de variantes do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Gobeil *et al.* (2021)

Em maio de 2021 a OMS declarou VOC, a Delta (B.1.617.2) uma variante primeiramente identificada na Índia em outubro de 2020. O sequenciamento genético desta variante evidenciou duas mutações no RDB, sendo elas L452R e T478K. Conforme os dados do mapeamento de Starr *et al.* (2020), a primeira mutação correlaciona-se a um aumento da expressão do RBD, sem alterar sua afinidade de ligação ao receptor em relação ao SARS-CoV-2 original. Já a segunda mutação, isoladamente, não causaria alterações tanto na expressão quanto na afinidade de ligação do RBD. Estas análises foram congruentes com o estudo computacional de Wozney *et al.* (2022), no qual a afinidade de ligação da variante Delta ao receptor ECA2 foi compatível com a do SARS-CoV-2 original. Quanto à transmissibilidade da variante, o estudo do monitoramento genômico dos vírus circulantes mostrou que rapidamente a variante Delta se tornou mais prevalente que as demais variantes e que o SARS-CoV-2 original, sugerindo alta transmissibilidade (Figura 10).

A última variante declarada VOC pela OMS, até o momento, é a Ômicron. Esta possui 31 mutações na proteína S, sendo 15 delas no RBD, conforme apresentado na Figura 12. Shah e Woo (2022) estudaram o impacto destas mutações na afinidade de ligação ao receptor por mutagênese computacional e avaliação da energia livre. Os autores observaram que apesar de individualmente cada mutação causar pequena alteração na afinidade ao receptor, o resultado conjunto de todas as mutações foi extremamente favorável à ligação do vírus à célula, com um aumento de 2,5 vezes da afinidade de ligação, estimada por mecânica molecular de área de superfície generalizada Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) quando comparado ao SARS-CoV-2 original. A alta transmissibilidade da variante Ômicron também pode ser observada por sua rápida prevalência em relação às demais variantes Figura 10.

Figura 12 - Quadro das mutações ocorridas na região do RBD da variante Ômicron

Protein systems	Variant Name (pango-lineage)	
	B.1.1.529	
Omicron	Missense Mutations	G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H
	Location	<div style="text-align: center;"> 334 526 </div>

Fonte: Adaptado de Wozney *et al.* (2022)

Diversos pesquisadores investigaram se as alterações moleculares resultantes das mutações seriam capazes que interferir na capacidade neutralizante dos anticorpos monoclonais aprovados para uso ou em diferentes fases de teste. Wang *et al.* (2021) demonstraram que, de 12 anticorpos monoclonais anti- RBD com capacidade neutralizante do SARS-CoV-2 original, 2 tiveram redução da capacidade neutralizante da variante Alfa enquanto 5 tiveram sua capacidade neutralizante quase abolida contra a variante Beta. Quanto à capacidade de neutralização do plasma de convalescentes, não houve redução da neutralização da variante Alfa, porém para variante Beta houve redução de mais de 9 vezes quando comparado ao vírus original. Os autores demonstraram resultados semelhantes com o soro de indivíduos vacinados com duas doses, dos grupos de estudo clínico de fase I, das vacinas Moderna SARS-CoV-2 mRNA 1273 e Pfizer BNT162b2. O soro de vacinados apresentou pequena redução da capacidade neutralizante para a variante Alfa, enquanto houve grande redução da capacidade neutralizante da variante Beta, sendo de 12 vezes para os vacinados com a vacina Moderna e 10 vezes para os vacinados com a vacina Pfizer, comparado à neutralização do SARS-COV-2 original.

A capacidade de escapar aos anticorpos monoclonais terapêuticos e ao soro de indivíduos vacinados ou convalescente pelas variantes Alfa, Beta e Gama também foi estudada por Hoffmann *et al.* (2021). A análise das respostas de mAb aprovados para uso terapêutico nos EUA mostrou redução contra as variantes Beta e Gama, assim como a capacidade de neutralização do plasma de convalescente e o soro de indivíduos vacinados com Pfizer BNT162b2. Entretanto, alguns inibidores biológicos em pesquisa mantinham sua capacidade de impedir a interação do vírus com o receptor, como por exemplo a ECA2 solúvel e o inibidor de TMPRSS2.

Planas *et al.* (2021), em estudo experimental analisou a sensibilidade da variante Delta aos anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico, bem como ao plasma de convalescentes e ao soro de indivíduos imunizados com as vacinas da Pfizer, Moderna e AstraZeneca. Os resultados mostraram que de quatro mAb terapêuticos já aprovados, apenas um perdeu seu potencial neutralizante para a variante. Quanto aos anticorpos monoclonais isolados de indivíduos previamente infectados, os autores verificaram que de quatro anticorpos anti-RBD, três mantiveram capacidade neutralizante à variante Delta, enquanto, dos 4 anticorpos anti-NTD testados, apenas um manteve alguma capacidade de neutralizar a variante. Ao analisar a resposta ao soro de indivíduos convalescentes ou indivíduos vacinados, os autores encontraram que o soro de indivíduos convalescentes não vacinados apresentava capacidade neutralizante após 6 meses da infecção, porém perdiam a capacidade após 12 meses da

infecção. Já o soro de indivíduos previamente infectados que haviam tomado apenas uma dose do imunizante mantinha total capacidade de neutralização da variante Delta. Ao estudar o soro de indivíduos vacinados, sem infecção prévia, foi verificado que a imunização com apenas uma dose não conferia capacidade neutralizante da variante ao soro destes indivíduos, porém essa capacidade era alcançada após a segunda dose da vacina. Assim, os autores concluíram que a variante possui alguma resistência à terapia com anticorpos monoclonais.

Em seu estudo sobre o impacto das mutações da variante Ômicron na afinidade de ligação ao receptor, Shah e Woo (2022) também investigaram o efeito das mudanças na capacidade neutralizantes de oito anticorpos monoclonais, sendo seis até então aprovados para uso emergencial nos EUA e 2 em estudos clínicos de fase III. Os autores demonstraram por simulações de dinâmica molecular que as mutações presentes na variante Ômicron causaram redução significativa na capacidade neutralizante de 7 dos 8 mAb estudados. Ao calcularem a energia de ligação livre pelos métodos MM-PBSA e MM-GBSA, os autores verificaram que a redução da afinidade de ligação ao receptor foi resultante em grande escala da redução do potencial eletrostático de ligação entre os mAb e a variante, quando comparado ao potencial eletrostático de ligação ao SARS-CoV-2 original.

O surgimento de variantes e a conseqüente possibilidade de escapar das vacinas e terapias conhecidas, ou até mesmo de testes diagnósticos, preocupam as autoridades mundiais. Diante deste fato, pesquisas com o objetivo de desenvolver métodos de profiláticos e de diagnóstico, bem como tratamento medicamentoso para a COVID-19, continuam a liderar o cenário científico mundial. É primordial que o diagnóstico da doença seja simples, rápido e preciso, além de economicamente viável, para que as medidas de contenção do avanço dos casos sejam mais efetivas, que haja maior controle das variantes e que novos surtos possam ser mitigados.

Até o momento, o diagnóstico laboratorial da COVID-19 se baseia na detecção do antígeno ou de anticorpos gerados contra o SARS-CoV-2. De modo geral, os métodos de detecção do antígeno em sua maioria utilizam amostras de *swab* de nasofaringe ou orofaringe e saliva, e podem detectar a presença do vírus por técnicas moleculares ou imunológicas. Já os métodos de verificação de anticorpos utilizam amostras de sangue ou soro dos indivíduos e técnicas imunológicas.

Dentre os exames moleculares, também chamados de métodos de amplificação de ácidos nucleicos, a Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reserva em Tempo Real (RT-PCR, do inglês *Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) é a técnica considerada atualmente o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19. O método utiliza

amostra de *swab* de nasofaringe ou orofaringe e detecta o RNA viral com grande especificidade e sensibilidade, em um tempo relativamente curto, entre duas e quatro horas (ROTONDO *et al.*, 2022). Entre suas limitações estão a necessidade de equipamento e pessoal especializados, a necessidade de procedimentos de biossegurança mais rigorosos devido à manipulação de material biológico com potencial infeccioso, o que em conjunto eleva o custo do exame, sendo inacessível para várias localidades em todo o mundo (WU *et al.*, 2022). Além disso, o método não permite a identificação de novas variantes do vírus, até que kits de detecção específicos para cada variantes sejam desenvolvidos para a técnica, o que pode resultar em casos falso-negativos (RAI *et al.*, 2021).

Outros métodos moleculares utilizados ainda com menor frequência são a PCR Digital de Gotículas, a Amplificação Isotérmica, os sistemas baseados em ferramentas de edição gênica como o CRISPR/Cas. Apesar de cada método possuir vantagens específicas, não são amplamente utilizados para diagnóstico da COVID-19 na prática clínica, com poucos exemplares aprovados disponíveis no mercado (RAI *et al.*, 2021; ROTONDO *et al.*, 2022).

Os métodos de sequenciamento genético também têm papel fundamental no diagnóstico e monitoramento do SARS-CoV-2 (RAI *et al.*, 2021). O *Next-Generation Sequencing*, ou NGS, foi utilizado desde o início da pandemia para o sequenciamento completo do material genético do SARS-CoV-2, o que permitiu a geração de bases de dados e posteriormente o desenvolvimento de *primers* e sondas necessários em métodos moleculares de identificação viral, como a própria RT-PCR. Além disso, a partir do mapeamento completo do genoma viral, foi possível avançar em pesquisas de biologia estrutural das proteínas e de mecanismos de interação do vírus à célula, resultando em avanços no desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos (RAI *et al.*, 2021; ROTONDO *et al.*, 2022). O NGS possui a vantagem de sequenciar material genético ainda desconhecido, tendo assim extrema importância na identificação de novas variantes do SARS-CoV-2. Os dados de sequenciamento genético do SARS-CoV-2 são disponibilizados gratuitamente em bases de dados internacionais e disponíveis na internet, como por exemplo o GenBank do *National Center Biotechnology Information* (NCBI), Centro de informações biotecnológicas dos EUA, e a *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Information* (GISAID), base de dados mundial criada em 2008 para compartilhar informações da Gripe Aviária (H5N1) que atualmente também compartilha informação de COVID-19 (ROTONDO *et al.*, 2022).

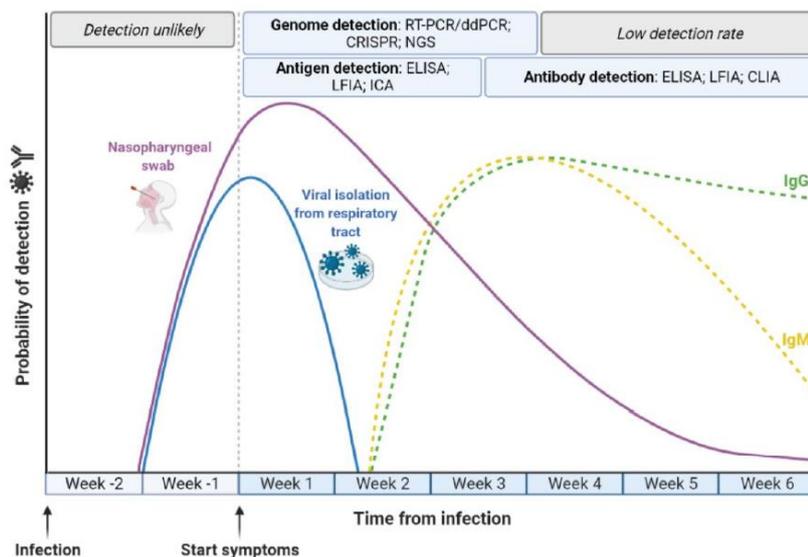
Além dos métodos moleculares, os baseados em técnicas imunológicas para a detecção tanto do antígeno como de anticorpos produzidos são amplamente utilizados nos controles clínico e sanitário da COVID-19. Os testes imunológicos são divididos em dois grupos, os de

detecção do antígeno e os de identificação de anticorpos, principalmente IgM e IgG (WU *et al.*, 2022). Atualmente diversos testes já estão aprovados para uso e disponíveis no mercado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/autotestes>) e pelo órgão responsável norte-americano, *Food and Drug Administration* - FDA (<https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/covid-19-test-basics>) e são baseados em uma ou mais técnicas tanto imunológicas como uma combinação de técnicas imunológicas e moleculares. Geralmente, estão divididos em três categorias, os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), os imunoenaios de fluxo lateral (LFIA do inglês *Lateral Flow Immunoassay*) e os imunoenaios quimioluminescentes (CLIA, do inglês *Chemiluminescent Immunoassay*) (WU *et al.*, 2022). Há ainda os ensaios de neutralização viral, que na prática clínica são menos utilizados, sendo seu uso mais frequente na pesquisa (ROTONDO *et al.*, 2022).

Os testes imunológicos de detecção de anticorpos utilizam amostras de sangue. Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) se baseiam na imobilização do antígeno, ou de proteínas imunogênicas como a proteína S ou N do SARS-CoV-2, em uma superfície sólida, para a detecção de anticorpos específicos para o antígeno de interesse na amostra testada. Após a adição e incubação da amostra com o antígeno imobilizado, um segundo anticorpo conjugado a uma enzima é adicionado. Na sequência é adicionado o substrato específico da enzima para que ocorra a reação enzimática e seja produzida luz. A leitura do resultado é feita por um espectrofotômetro que irá ler a absorbância em um comprimento de onda específico para tal reação enzimática. Caso haja o anticorpo específico de interesse na amostra, ocorrerá a reação enzimática e maior absorbância será observada na leitura do espectrofotômetro (ALHARBI *et al.*, 2022; RAI *et al.*, 2021). No imunoensaio de quimioluminescência, o princípio é semelhante, porém o antígeno conjugado a um fluoróforo é imobilizado em microesferas magnéticas e então incubado com a amostra em investigação. Em seguida, as microesferas são removidas por separação magnética e então incubadas com o substrato quimioluminescente. Caso haja na amostra os anticorpos específicos contra o antígeno pesquisado, haverá a produção de luz e sua quantificação poderá ser feita em um luminômetro. O ensaio de quimioluminescência possui as vantagens de menor tempos de realização e maior sensibilidade que os ensaios enzimáticos, além de maior estabilidade e ausência de interferências no sinal (ROTONDO *et al.*, 2022). Há ainda inúmeros métodos de imunoenaios de fluxo lateral aprovados para uso na investigação de anticorpos produzidos contra o SARS-CoV-2. A maioria destes também se baseia no princípio de imobilizar o antígeno e fazer a detecção com um anticorpo secundário conjugado a uma enzima. Porém, exames de detecção de anticorpos têm

sua maior sensibilidade apenas após duas semanas do início dos sintomas, devido à própria fisiologia da produção de anticorpos, dificultando assim o diagnóstico precoce da COVID-19 por estes testes (Figura 13).

Figura 13 - Ilustração da probabilidade da detecção viral ou de anticorpos em função das semanas de infecção



Fonte: Adaptado de Rotondo *et al.* (2022)

Os ensaios de detecção do antígeno se baseiam nos métodos enzimático (ELISA) e de fluxo lateral (LFIA) e o princípio é o de captura do antígeno por um anticorpo específico imobilizado. Estes testes utilizam amostras de *swab* de nasofaringe ou orofaringe e de saliva. Após a incubação com a amostra, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima faz a detecção por mudança de cor ao entrar em contato com o substrato, sendo feita a leitura do resultado em espectrofotômetro para o ELISA ou visualmente para o LFIA (ALHARBI *et al.*, 2022). Os imunoenaios de fluxo lateral podem ser adaptados para cassetes e sua realização ser feita em laboratórios, postos de testagem e até mesmo em casa (KIM; LEE, 2022; RAI *et al.*, 2021). As principais vantagens dos testes imunológicos de detecção de antígenos são sua maior rapidez no resultado (por exemplo o LFIA), menor necessidade de equipamentos ou pessoal especializados para execução e menor custo total quando comparados aos testes moleculares. Porém possuem limitações como uma menor sensibilidade (KIM; LEE, 2022), o que pode ser bastante impactado caso uma nova variante escape ao anticorpo utilizado no teste.

Após mais de dois anos do surgimento da COVID-19, o número de casos e mortes continuam a subir, já ultrapassando a marca de 610.866.000 casos e 6.510.000 mortes. Com o avanço no desenvolvimento das vacinas, os casos de evolução para um quadro clínico crítico diminuíram e são mais comuns na população idosa, acima de 65 anos, com alguma comorbidade prévia ou sem esquema vacinal completo. Porém, atualmente ainda não existe tratamento específico e eficaz para a COVID-19, continuando ser necessário o desenvolvimento de alternativas profiláticas e terapêuticas. Além disso, o diagnóstico precoce de forma rápida e eficiente é de extrema relevância para o adequado controle da propagação da doença. O surgimento de novas variantes torna mais desafiador o desenvolvimento de anticorpos monoclonais de uso terapêutico e para métodos diagnósticos, fazendo-se necessárias atualizações dos testes realizados com variantes anteriores ou com o SARS-COV-2 original.

O presente estudo é parte de um amplo projeto de pesquisa para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos contra o SARS-CoV-2, no qual o uso do receptor ECA2 recombinante é essencial para os ensaios de funcionalidade. Neste contexto, sua produção configura também estratégia de redução de custos, uma vez que pode ser otimizada para produção em maior escala.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir a proteína ECA2 recombinante solúvel, para utilização em ensaios no desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos contra SARS-CoV-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1 Expressar a proteína ECA2 recombinante em célula de mamífero;
- 3.2 Conjugar a proteína recombinante à biotina;
- 3.3 Realizar ensaio de ligação da proteína recombinante à proteína viral;
- 3.4 Testar a proteína recombinante expressa em ensaio de inibição da ligação da proteína viral ao receptor pelos anticorpos produzidos no amplo Projeto.

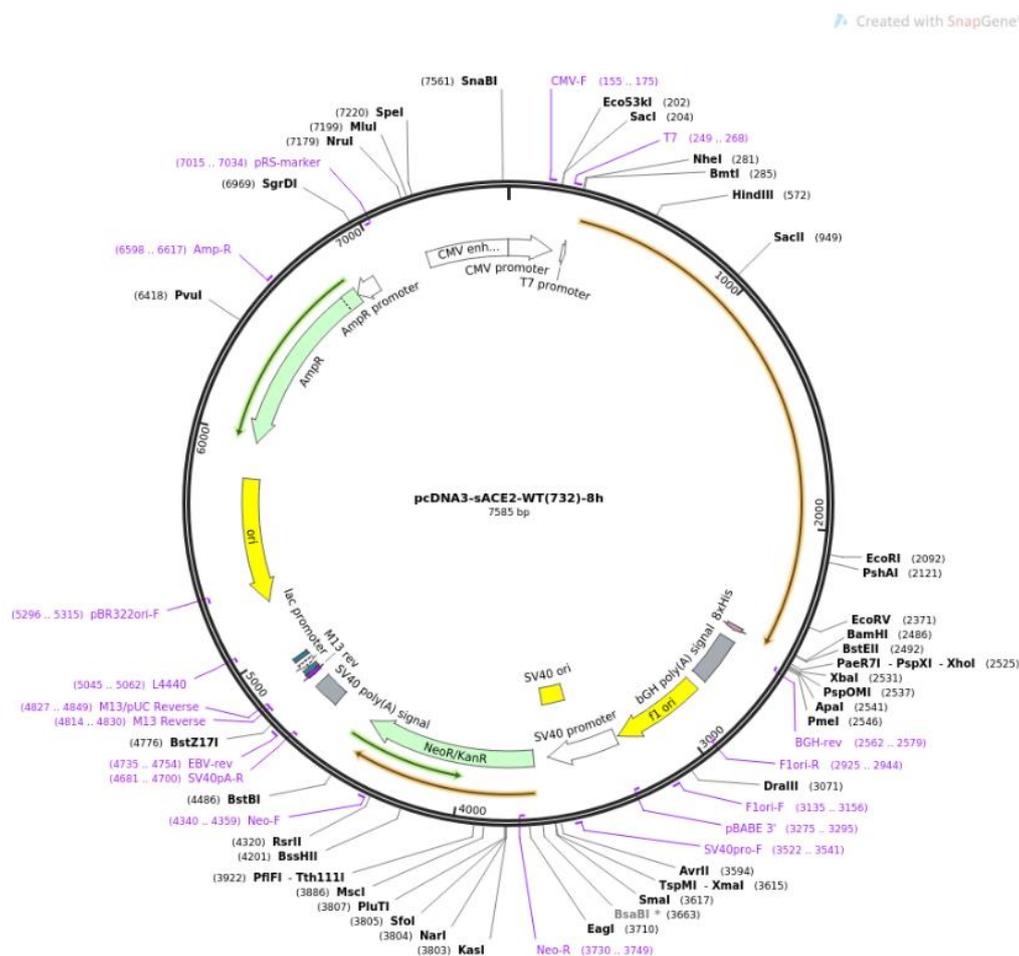
4 MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.1.1 Preparo do Vetor de Expressão

Para o preparo do DNA plasmideal para transfecção foi utilizado o kit comercial Qiagen® Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen HB-0155) e seguido o manual do fabricante. As bactérias *Escherichia coli* contendo o vetor (Addgene pcDNA3-sACE2-WT(732)-8h Plasmid # 154101 - Figura 14) foram estriadas em uma placa de Petri com meio sólido de Luria-Bertani com Ágar e Ampicilina 100 µg/mL e deixadas durante a noite (aproximadamente 15 h) em estufa a 37°C. No dia seguinte, as placas foram retidas da estufa e deixadas a 4°C até o momento de fazer o inóculo. Este foi feito a partir de uma cultura isolada em 30 mL de meio LB, divididos em dois falcons de 50 mL, deixados durante a noite, a 37°C, sob agitação de 125 rpm.

Figura 14 - Mapa do vetor de expressão da ECA2 recombinante



Fonte: Disponível em: <https://www.addgene.org/154101/> Acesso em: 19 set. 2022

No dia seguinte, as bactérias foram colhidas para a extração do DNA plasmideal com o kit comercial. Para isto os inóculos foram centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias ressuspendido em 4 mL do buffer P1 fornecido no kit. A partir deste ponto, foi seguido o manual do fabricante para o protocolo de alta produção.

Ao final, o DNA foi quantificado por Nanodrop™ 2000C (Thermo Scientific) e estocado a -20°C.

4.1.2 Preparo das Células de Mamíferos para Transfecção

4.1.2.1 HEK 293F

Foi descongelado 1 criotubo do estoque do LabMIB contendo 1 mL com 1×10^7 células Freestyle™ 293F (ThermoFischer Scientific R790-07) em meio FreeStyle293™ Expression Medium (ThermoFischer Scientific 12338018) com dimetilsulfóxido (DMSO) 10%. O criotubo foi retirado do freezer -80°C e imediatamente descongelado em banho-maria 37°C. Pouco antes do conteúdo do criotubo estar totalmente descongelado, foi feita a descontaminação externa do tubo com etanol 70% e, então, em cabine de fluxo laminar, todo o volume do criotubo foi retirado com o uso de um pipeta P1000 e transferido para um falcon de 15 mL contendo 4 mL de meio pré-aquecido a 37°C em banho-maria. As células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado para a retirada do DMSO. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio novo pré-aquecido a 37°C em banho-maria e todo o volume transferido para um Erlenmeyer de policarbonato de 125 mL, contendo 30 mL de meio de cultura FreeStyle293™ Expression Medium. O Erlenmeyer foi colocado em estufa a 37°C, com CO₂ a 5% e sob agitação de 125 rpm.

A partir do dia seguinte, foram verificadas a densidade e a viabilidade das células diariamente e feita a passagem de subcultura quando a densidade alcançava $1,5 \times 10^6$ células/mL ou mais (geralmente a cada 24h ou 48h). Quando as células atingiram viabilidade maior que 95% foram consideradas recuperadas do descongelamento e prontas para a transfecção. Parte da cultura foi criopreservada, conforme o protocolo recomendado pelo fabricante, para manutenção do estoque de células de mamíferos.

4.1.3 Transfecção das Células de Mamíferos

Para a transfecção das células HEK293F foi utilizado o plasmídeo previamente preparado. Foi seguido o manual do fabricante e todo o procedimento foi realizado na cabine de fluxo laminar dedicada à cultura de células de mamíferos.

4.1.3.1 HEK 293F

Para a produção da proteína ECA2 recombinante, foi transfectada uma cultura de 30 mL, em um Erlenmeyer de policarbonato de 125 mL. No dia anterior à transfecção (D-1), as células HEK 293F foram ajustadas para uma densidade de $0,6 \times 10^6$ células/mL, de modo a estarem no dia seguinte com densidade superior a $1,0 \times 10^6$ células/mL. No dia da transfecção (D0), a densidade foi novamente ajustada, para $1,0 \times 10^6$ células/mL. Foram preparados dois microtubos A e B. No tubo A foi colocado 37,5 µg de DNA plasmídeo e q.s.p 600 µL de meio OptiPRO™ SFM (ThermoFischer Scientific 12309050). No tubo B, foi acrescentado 37,5 µL de reagente de transfecção FreeStyle™ MAX Reagent (ThermoFischer Scientific 16447100) e q.s.p 600 µL de meio OptiPRO™ SFM e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, o conteúdo do tubo A foi adicionado no tubo B e incubado em temperatura ambiente por mais 15 minutos para a formação dos complexos lipídicos de DNA. Ao final deste período, todo o conteúdo do tubo B foi lentamente adicionado ao Erlenmeyer contendo as células, mantendo uma agitação circular. Por fim, o Erlenmeyer foi incubado em estufa a 37°C, CO₂ 5% sob agitação de 125 rpm.

4.1.4 Expressão Transiente da Proteína Recombinante

A expressão da proteína recombinante ECA2 foi realizada de forma transiente. Após a transfecção do plasmídeo, a densidade e a viabilidade das células foram contabilizadas diariamente e a proteína foi coletada no terceiro dia após a transfecção (D3), sendo acrescentado meio novo para manter a expressão por mais 7 dias. No 10º dia (D10) foi coletada novamente toda a proteína expressa. Para a coleta da proteína expressa, o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para um tubo falcon estéril de 50 mL e centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo falcon estéril de 50 mL e armazenado a 4°C até a purificação. O pellet de células foi descontaminado em autoclave para ser então descartado.

4.1.5 Purificação da Proteína Recombinante por Cromatografia de Afinidade

Para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade, à solução de tampão da amostra acrescentado tampão de ligação (0,5 M NaCl, 40 mM NaH₂PO₄ 10 mM imidazol, pH 7,4). A purificação da proteína recombinante ECA2 foi realizada por cromatografia de afinidade ao Níquel com a resina HisPur Ni-NTA ThermoFischer (Ref: 88221), utilizando o protocolo de centrifugação. Por questões externas ao estudo, foi utilizado apenas o sobrenadante colhido no D3 de expressão.

Primeiramente, 50 µL da resina foram adicionados a uma coluna de centrífuga (ThermoFischer Scientific™ 89869) e centrifugado a 700 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado para a retirada do etanol e a resina ressuspendida em 100 µL de tampão de ligação. Então, os 100 µL de resina foram adicionados à amostra (30 mL) e incubados em temperatura ambiente, em rotação 360°, por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos e o pellet de resina foi coletado com pipeta P200 e ponteira de ponta larga, sendo transferido para nova microcoluna de centrífuga. A resina então foi lavada com 700 µL de tampão de lavagem (0,5 M NaCl, 40 mM NaH₂PO₄ 50 mM imidazol, pH 7,4) e centrifugada a 700 x g por 2 minutos. O procedimento de lavagem foi repetido 2 vezes. Após as lavagens, foi trocado o tubo coletor e realizada a eluição da proteína. Para isso foram adicionados 500 µL de tampão de eluição (0,5 M NaCl, 40 mM NaH₂PO₄ 500 mM imidazol, pH 7,4), incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e, então, centrifugados a 700 x g por 2 minutos.

Após a purificação, o tampão foi substituído por PBS e as proteínas foram concentradas para 250 µL em filtro Amicon® Ultra, 30 kDa (Ultracell® MerckMillipore UFC 503024). A proteína foi então quantificada utilizando o NanoDrop® 2000 e armazenada a 4°C até sua utilização nos ensaios. A validação da expressão foi feita por Dot Blot e a pureza da proteína foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS PAGE).

4.1.6 Dot Blot

Para validar a produção da proteína ECA2 recombinante, foi realizado um ensaio de Dot Blot. Para isso, 2 µL da proteína purificada foram adicionados em uma membrana de nitrocelulose e aguardada a secagem da amostra. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite em pó 5% diluído em PBS (solução salina tamponada com fostato) por 1 h, em temperatura ambiente, sob agitação. Na sequência a membrana foi lavada por 3 vezes, utilizando PBST

0,05% (PBS com Tween-20 a 0,05%) e mantendo-a sob agitação por 5 minutos. Após as lavagens, foi adicionado anticorpo anti-Histag (Invitrogen) conjugado a enzima peroxidase de rábano (HRP), diluído 1:1000 em PBS e incubado por 1h em temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, após a membrana ser novamente lavada conforme descrito, foi adicionado substrato tetrametilbenzidina (TBM) e novamente incubado em temperatura ambiente, sob agitação, por tempo suficiente para a verificação do resultado visualmente (aproximadamente 15 minutos).

4.1.7 SDS-PAGE

A pureza da proteína expressa verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante. Para isso foi feito um gel de poliacrilamida 12% e a amostra da proteína foi preparada 4:1 em tampão redutor (SDS 4%, β -mercaptoetanol 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,1%), sendo colocada em banho-maria de água fervente por 5 minutos, seguidos de 2 minutos a 4°C. A seguir, a amostra foi adicionada ao gel juntamente com o marcador (ThermoFischer Ref: 26616) e corrida a eletroforese a 120V. Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad), durante a noite. No dia seguinte, o gel foi lavado com água destilada e descorado com solução descorante (etanol 30%, ácido acético glacial 10%).

4.1.8 Conjugação da Proteína Recombinante à Biotina

Para possibilitar a realização de alguns ensaios, a proteína ECA2 recombinante expressa foi conjugada à biotina utilizando kit comercial (Sigma-Aldrich® H1779), conforme o manual de instruções do fabricante. Foi calculada a quantidade de proteína que seria conjugada e então calculado um excesso molar de 20 vezes de biotina, utilizando o cálculo exposto no manual. A seguir, a biotina foi retirada da refrigeração e equilibrada em temperatura ambiente e, então, dissolvida a 10 mM em DMSO anidro. Após, a solução reagente de biotina foi adicionada à proteína ECA2 recombinante e incubada a 4°C durante a noite. Por fim, o excesso de biotina que não reagiu com a proteína foi eliminado com filtro Amicon® Ultra, 30kDa e a proteína recombinante biotinilada foi armazenada a 4°C para ensaios posteriores.

4.2 ENSAIOS DE LIGAÇÃO À PROTEÍNA VIRAL

4.2.1 ELISA

Para determinar a ligação da proteína recombinante à proteína S, foi realizado ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Para isto, a placa de 96 poços foi sensibilizada com 50 µL da proteína Spike original (R&D Systems – 10549-CV) a 2 µg/mL em PBS e incubada por 1h a 37°C. Na sequência, a placa foi lavada 3 vezes com 300 µL de PBST 0,1%, foi adicionado a cada poço 300 µL solução de bloqueio (BSA 1% em PBS) e a placa incubada por 1h a 37°C. Após esse tempo, a placa foi lavada novamente e 50 µL da proteína ECA2 recombinante biotinizada (em duas concentrações, 1 µg/mL e 2 µg/mL, diluídas em solução de bloqueio) foram adicionados a cada poço, e a placa foi novamente incubada por 1h a 37°C. Após lavagens como descrito, foram adicionados 50 µL de estreptavidina conjugada com HRP (diluída em solução de bloqueio 1:1.000) e incubado por 1h a 37°C. Por fim, a placa foi revelada com a adição de substrato de 50 µL de TMB, incubada por aproximadamente 30 min a 37°C e a reação interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 1 M. A leitura do resultado foi feita no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm para determinação da absorbância.

4.2.2 Citometria de Fluxo

Para testar a ligação em condição não desnaturante, foi realizada citometria de fluxo em colaboração com a pesquisadora Verence Paredes. Para esse ensaio foram utilizadas células HEK293F transfectadas com os vetores letivirais das variantes Alfa (Addgene pCDNA3.3_CoV2_B.1.1.7 Plasmid #170451) e Gama (Addgene pCDNA3.3_CoV2_P1 Plasmid #170450) para a expressão da proteína S na superfície celular.

No D2 pós-transfecção, as células coletadas por centrifugação a 1.200 rpm durante 5 minutos, em temperatura ambiente. O meio de cultura foi descartado e as células ressuspendidas em solução de bloqueio (albumina de soro bovino - BSA 0,5%, PBS e Soro Fetal Bovino 1%) para uma densidade final de 1×10^7 células/mL. Foram adicionados 100 µL em cada microtubo e as células foram incubadas com a ECA2 diluída (a 1 µg/mL) em solução de bloqueio a 37°C, em agitação a 125rpm por 1h. A seguir, foram lavadas por 3 vezes com 1 mL PBS, sendo centrifugadas a 400xg por 3 minutos e o sobrenadante descartado com auxílio

de uma pipeta P1000, a cada lavagem. Ao final as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de bloqueio com estreptavidina conjugada com AlexaFluor™ 488 (Invitrogen S11223) diluída 1:2000 e novamente incubadas a 37°C, em agitação a 125rpm por 1h. Por fim, as células foram novamente lavadas 3 vezes como na etapa anterior e ressuspensas em PBS com DAPI (4'-6'-diamino-2-fenilindol) 1 µg/mL. Ao final, as amostras foram mantidas em gelo protegidas da luz até a leitura no citômetro.

4.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO À PROTEÍNA VIRAL

4.3.1 Citometria de Fluxo

Para verificar se o método seria adequado para o ensaio de inibição da interação da ECA2 recombinante produzida com a proteína S expressa na superfície celular por vetores lentivirais, foi realizada nova citometria de fluxo, em colaboração com a pesquisadora Verence Paredes. Para esse ensaio também foram utilizadas células HEK 293F transfectadas com os vetores lentivirais das variantes Alfa e Gama.

Conforme o protocolo descrito anteriormente, no D2 pós-transfecção, as células foram coletadas e ressuspensas em solução de bloqueio (BSA 0,5%, PBS e Soro Fetal Bovino 1%) para uma densidade final de 1×10^7 células/mL, sendo adicionados 100 µL em cada microtubo. As células foram incubadas primeiramente com 100 µL do scFv (2 µg/mL) por 30 minutos a 37°C e posteriormente com 100 µL de ECA2 recombinante (1 µg/mL) a 37°C por 1h, em agitação a 125rpm. Após esse período, foram lavadas por 3 vezes com 1 mL PBS, sendo centrifugadas a 400xg por 3 minutos e o sobrenadante descartado entre as lavagens com auxílio de uma pipeta P1000. Então, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de bloqueio com estreptavidina conjugada com AlexaFluor™ 488 (1:2000) e incubadas a 37°C, em agitação a 125rpm por 1 hora. Por fim, as células foram novamente lavadas 3 vezes e ressuspensas em PBS com DAPI 1 µg/mL. As amostras foram mantidas em gelo e protegidas da luz até a leitura no citômetro de fluxo.

Posteriormente, foram realizados novos ensaios de citometria de fluxo para otimização da concentração de ECA2 recombinante e para titulação dos anticorpos no ensaio de inibição da ligação da proteína viral ao receptor. Para isso, o mesmo protocolo descrito foi utilizado.

No ensaio de otimização da concentração da ECA2 recombinante, as células, após colhidas e ressuspensas em solução de bloqueio, foram incubadas com a ECA2 recombinante em 5 diluições seriadas 1:2 (a partir de 1 µg/mL) por 1 h a 37°C sob agitação. Em seguida, as

células foram lavadas e incubadas por mais uma hora com estreptavidina conjugada com AlexaFluor™ 488. Então, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em PBS com DAPI 1 µg/mL. As amostras foram mantidas em gelo e protegidas da luz até a leitura no citômetro de fluxo.

No ensaio de titulação dos anticorpos na inibição da interação da proteína viral ao receptor, as células, colhidas e ressuspensas em solução de bloqueio, foram incubadas com a ECA2 recombinante diluída 0,5 µg/mL por 1h a 37°C sob agitação. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por mais uma hora com 4 diluições seriadas 1:2 (iniciando em 10 µg/mL) dos anticorpos produzidos no amplo Projeto. Após esse período, as células foram lavadas e incubadas novamente com estreptavidina conjugada com AlexaFluor™ 488. Por fim, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em PBS com DAPI 1 µg/mL. As amostras foram mantidas em gelo e protegidas da luz até a leitura no citômetro de fluxo.

4.4 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Com o objetivo de otimizar a produtividade da proteína recombinante, foi realizada nova expressão da proteína recombinante em duas linhagens de células de mamíferos. Para esta nova expressão do receptor ECA2, foi utilizado o mesmo vetor preparado anteriormente, o qual estava estocado a -20°C.

4.4.1 Preparo das Células de Mamíferos para Transfecção

Nesta segunda etapa, foram utilizadas duas linhagens celulares de mamíferos para a expressão da proteína recombinante, as células ExpiCHO e as células HEK293F.

4.4.1.1 ExpiCHO

O kit comercial de expressão em células ExpiCHO-S™ (Thermo Fischer Scientific A29133) foi adquirido pelo LabMIB. As células foram descongeladas para expansão e estoque pelo professor André Nicola. Uma alíquota da cultura em expansão, após ser considerada recuperada do descongelamento, foi cedida para este estudo.

As células foram mantidas em 25 mL de meio de cultura ExpiCHO™ Expression Medium, em Erlenmeyer de policarbonato de 125 mL, em atmosfera úmida de CO₂ 8% a 37°C,

sob agitação de 125rpm. A viabilidade e a densidade das células foram monitoradas a cada 48h ou 72h e a subcultura feita sempre que a densidade atingia 4×10^6 – 6×10^6 células/mL.

4.4.1.2 HEK293F

O preparo das células HEK 293F seguiu o protocolo utilizado na produção do primeiro lote, descrito anteriormente. Com objetivo de melhor comparação das expressões nas diferentes linhagens celulares, a expressão do segundo lote da proteína recombinante foi realizada em 25 mL de cultura celular.

4.4.2 Transfecção das Células de Mamíferos

4.4.2.1 ExpiCHO

No dia anterior à transfecção, a densidade da cultura foi ajustada para 4×10^6 células/mL, conforme o manual de instruções. No dia da transfecção (D0), a densidade foi novamente ajustada para 6×10^6 células/mL em meio novo pré-aquecido a 37°C, e a viabilidade verificada, sendo de 99,7%. Em seguida foram preparados os reagentes de transfecção conforme as orientações do guia do usuário. Em um microtubo A, foram diluídos 25 µg de DNA plasmideal em 1 mL de meio OptiPRO™. Em um microtubo B, foi adicionado 80 µL do reagente de transfecção ExpiFectamine™ CHO Reagent a 1 mL de meio OptiPRO™. Imediatamente após, o conteúdo do tubo B foi adicionado no tubo A e incubado por 5 minutos para a formação dos complexos lipídeos de DNA. Por fim, a solução foi adicionada à cultura de células lentamente, mantendo movimentos circulares do Erlenmeyer. A cultura foi mantida na estufa a 37°C com atmosfera úmida de CO₂ a 8%, sob agitação de 125 rpm.

4.4.2.2 HEK293F

A transfecção das células HEK293F para a produção do segundo lote de proteínas recombinantes seguiu o mesmo protocolo descrito para o primeiro lote, porém foi transfectado um volume de 25 mL de cultura e os volumes de DNA, reagente e meio foram ajustados proporcionalmente. Após a transfecção, as células foram mantidas na estufa com atmosfera úmida de CO₂ a 8%, a 37°C, sob agitação de 125 rpm.

4.4.3 Expressão Transiente da Proteína Recombinante

4.4.3.1 ExpiCHO

A expressão da proteína recombinante ECA2 em células ExpiCHO foi realizada de forma transiente, seguindo o protocolo padrão do manual de instruções. No primeiro dia após a transfecção, foram adicionados 150 µL de ExpiCHO™ Enhancer e 6 mL de ExpiCHO™ Feed. A densidade e a viabilidade das células foram monitorizadas diariamente e a proteína foi coletada quando a viabilidade caiu para <60%, no 11º dia (D11) após a transfecção. Para a coleta da proteína, toda a cultura foi transferida para um falcon estéril de 50 mL e centrifugada a 1.200 rpm, por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em novo falcon estéril de 50 mL e armazenado a 4°C até a purificação. O pellet de células foi descartado conforme o fluxo de organismos geneticamente modificados do LabMIB.

4.4.3.2 HEK 293F

A produção do segundo lote de proteína recombinante ECA2 em células HEK 293F também foi realizada por expressão forma transiente. Porém a coleta da proteína não foi realizada em duas etapas. Após a transfecção, a densidade e a viabilidade das células foram contabilizadas diariamente e a proteína foi coletada quando a viabilidade diminuiu para < 60% (no 7º dia após a transfecção – D7). A coleta da proteína foi realizada conforme descrito anteriormente e o sobrenadante contendo a proteína armazenado a 4°C até a purificação.

4.4.4 Purificação da Proteína Recombinante por Cromatografia de Afinidade

A purificação da proteína produzida no segundo lote foi realizada também por cromatografia de afinidade, porém pelo método gravitacional. As colunas foram montadas conforme o manual de instruções do fabricante. Foram adicionados 800 µL da resina 1:2 em etanol 70% à coluna e então foram adicionados 2,5 mL de tampão de ligação. Após a passagem do tampão de ligação, foi adicionado aos poucos todo o volume do sobrenadante contendo a proteína recombinante (aproximadamente 25 mL). Após o término da passagem do sobrenadante, foi realizada a lavagem da resina com 3x 800 µL do tampão de lavagem. Em seguida, a proteína foi eluída 5 vezes em 400 µL de tampão de eluição cada. Os volumes de passagem na coluna foram coletados e armazenados a cada etapa separadamente para controle e testes posteriores. Após a purificação da proteína, foi realizada a troca do tampão de eluição

por PBS em colunas de gel-filtração (Merck PD10 Sephadex G-25 Medium). Ao final, a pureza da proteína foi verificada por Western Blot.

4.4.5 Western Blot

Para validar a produção e verificar a pureza da proteína expressa nas diferentes linhagens de células de mamíferos, foi realizado um Western Blot. Para isso, primeiramente foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condição desnaturante, conforme o protocolo descrito anteriormente, utilizando 12 µl de proteína 4:1 em tampão de amostra. Após correr a eletroforese, a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com solução de leite em pó 5% em PBS por 1h em temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST 0,05% por 3 vezes e incubada com anticorpo anti-Histag conjugado com HRP (Thermo Scientific) diluído 1:1000 em solução de bloqueio, por mais 1h. Ao final, após lavada, a membrana foi revelada com substrato TMB e o resultado registrado no fotodocumentador.

4.4.6 Conjugação da Proteína Recombinante à Biotina

A conjugação da proteína à biotina foi feita utilizando o kit comercial da Sigma-Aldrich® (Ref: H1779), conforme o protocolo já descrito, seguindo as orientações do fabricante. O excesso de biotina não conjugada foi eliminado por gel-filtração, e posteriormente a proteína ECA2 conjugada à biotina foi concentrada, utilizando filtro Amicon™ Ultra 30 kDa. A proteína foi quantificada no Nanodrop™ 2000 e armazenada a 4°C até a utilização nos ensaios.

4.4.7 Análise Dos Dados

Os resultados numéricos dos ensaios de ELISA e citometria de fluxo foram analisados e tratados com o programa GraphPad Prism 9.4.1 para a elaboração de gráficos. Para os resultados dos ELISA, foram calculados as médias e os erros padrão. E para o cálculo do valor de p foi utilizado ANOVA aninhado. Para os resultados das citometrias de fluxo, os intervalos de confiança de 95% foram calculados com o método de Wilson/Brown e os valores de p foram calculados por teste exato de Fisher.

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO TRANSIENTE E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ECA2 RECOMBINANTE

A proteína ECA2 recombinante expressa de forma transiente em células de mamíferos, após ser purificada por cromatografia de afinidade e concentrada em 250 μ L com filtro Amicon™ Ultra (30kDa), foi quantificada no Nanodrop™ 2000, sendo a concentração final de 43 μ g/mL, e validada por Dot Blot utilizando anticorpo anti-Histidina (Figura 15).

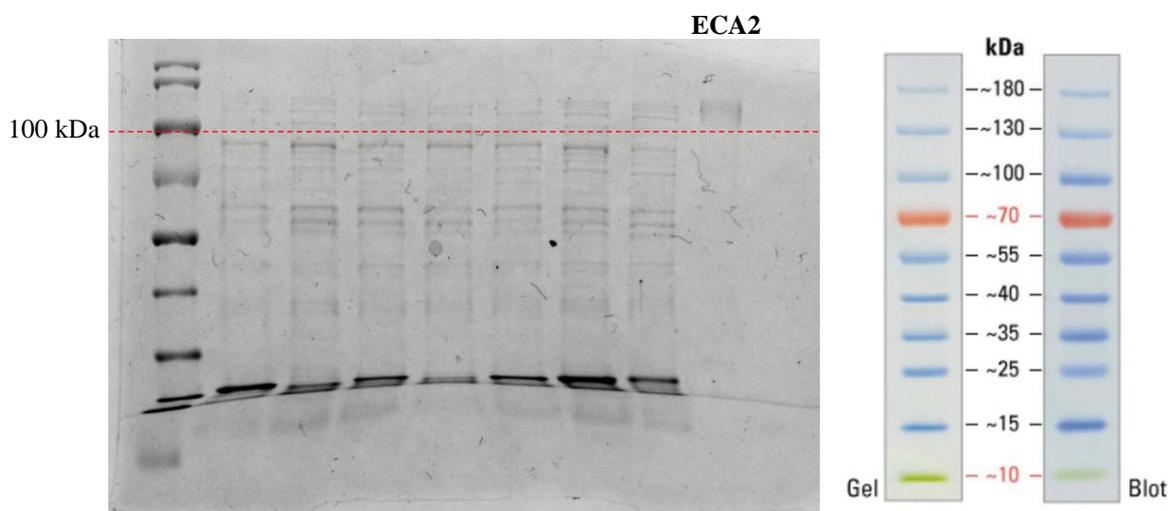
Figura 15 – Fotografia da membrana de Dot Blot da ECA2 recombinante expressa em HEK 293F, detectado com anticorpo anti-Histidina conjugado a HRP



Fonte: Arquivo pessoal

Para verificar a pureza da proteína ECA2 recombinante, foi realizado SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%, verificando-se a banda em aproximadamente 110kDa (Figura 16).

Figura 16 – Fotografia de gel de SDS-PAGE para verificação da pureza da ECA2 expressa em HEK293F, com linha pontilhada indicando a banda de peso molecular de 100 kDa (esquerda) e referência do peso molecular segundo o marcador ThermoScientific™ ref 26617 (direita)



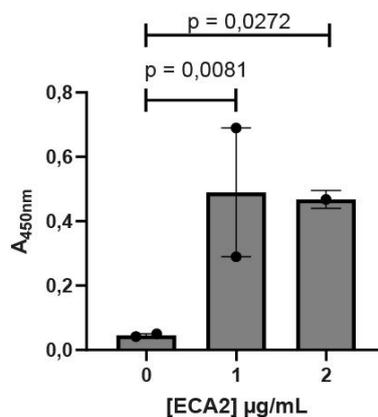
Fonte: Arquivo pessoal e manual do fabricante disponível em:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617?SID=srch-hj-26617>. Acesso em 21 set. 2022

5.2 ELISA DE LIGAÇÃO DA ECA2 RECOMBINANTE À PROTEÍNA SPIKE ORIGINAL

Para verificar se a ECA2 recombinante produzida se liga à proteína Spike original, foi realizado um ELISA em duas concentrações diferentes, 1 µg/mL e 2 µg/mL, de duas alíquotas biotiniladas separadamente. Foi observada ligação do receptor recombinante à Spike original nas duas concentrações (Figura 17) com absorvância mensurada a 450 nm.

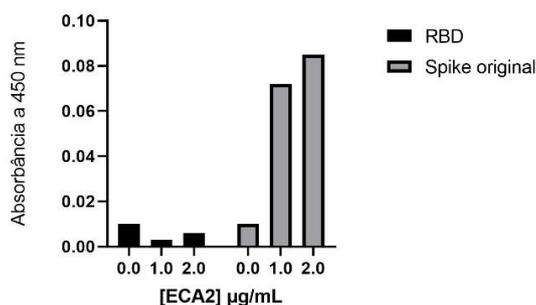
Figura 17 – Gráfico do resultado do ELISA de ligação ECA2 à proteína Spike original de SARS-CoV-2



Fonte: Elaborado pela autora. As barras são médias e as barras de erro são erro padrão. Os valores de p foram calculados por ANOVA aninhado.

Ao comparar os resultados obtidos com a ligação da ECA2 recombinante expressa em células HEK293F com os resultados de ELISA anteriormente realizado com ECA2 comercial (Sino Biological inc –10108-H08H-B), foi observado diferença nos valores de absorvância, sendo maiores os valores mensurados na ligação da ECA2 recombinante expressa neste estudo, nas duas concentrações testadas (Figura 18).

Figura 18 – Gráfico da absorvância a 450 nm da ligação da ECA2 recombinante comercial ao RBD e à proteína do SARS-COV-2 original

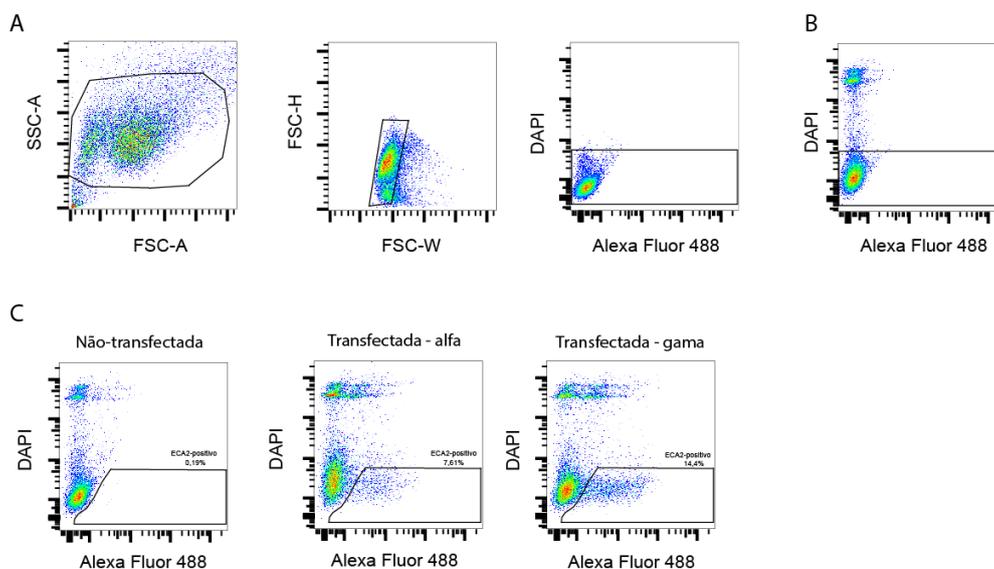


Fonte: Elaborado pela autora

5.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Para confirmar a ligação da ECA2 recombinante à proteína Spike em condição não desnaturante, foi realizada citometria de fluxo. Células HEK293F foram transfectadas com vetores das variantes Alfa e Gama para expressão na superfície celular e então incubadas com o receptor ECA2 biotilado, sendo marcadas posteriormente com estreptavidina conjugada com AlexaFluor™ 488. Na Figura 19, o painel A apresenta as estratégias de *gating* utilizadas e o painel B as células transfectadas com a variante Gama e coradas com DAPI. Como mostrado na Figura 19 no painel C, foi verificada ligação de 7,61% e 14,4% das células expressando as variantes Alfa e Gama, respectivamente.

Figura 19 - Ligação da ECA2 recombinante às proteínas S das variantes Alfa e Gama



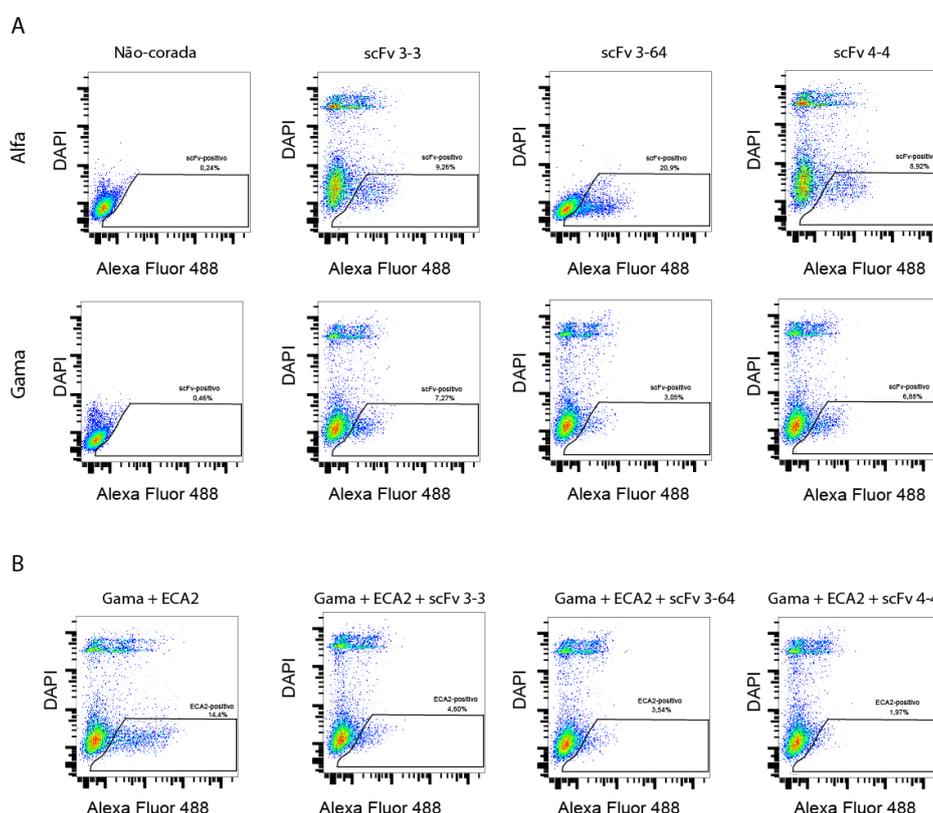
Fonte: Elaborado pela autora. (A) Estratégia de *gating*. Células transfectadas com Gama não coradas. O painel à esquerda mostra o primeiro gate para seleção de células (FSC-A x SSC-A). O painel do meio mostra o gate seguinte, que contém células únicas (FSC-W x FSC-H). Por fim, o painel da direita mostra a coloração dessas células únicas com DAPI e estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 488. (B) Controle em que as mesmas células mostradas no painel A foram coradas com DAPI. (C) Ligação de ECA2 recombinantes. Células não-transfectadas e transfectadas para expressão da proteína Spike das variantes Alfa e Gama foram incubadas com ECA2 solúvel biotilada e estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 488. Em comparação com o gráfico à esquerda, os dois outros gráficos mostram que a ECA2 recombinante se ligou à Spike das variantes Alfa e Gama.

Posteriormente, para verificar se a citometria de fluxo poderia ser uma estratégia para ensaios de inibição da interação da proteína Spike com o receptor ECA2 no desenvolvimento dos anticorpos monoclonais humanos do amplo Projeto, foram realizados dois ensaios. Primeiramente foi realizado um ensaio de ligação de três anticorpos no formato scFv (3-3, 3-

64 e 4-4) às células transfectadas com as variantes Alfa e Gama. Para a variante Alfa, foi verificada ligação de 9,26% ao scFv 3-3, 20,9% ao scFv 3-64 e 8,92% ao scFv 4-4. Já para a variante Gama, foi observada ligação de 7,27%, 3,05% e 6,88% para os scFv 3-3, 3-64 e 4-4, respectivamente (Figura 20, painel A).

Em seguida, foi realizado um ensaio de inibição da ligação da ECA2 recombinante à proteína viral da variante Gama por estes três anticorpos. Conforme apresentado na Figura 20 no painel B, os anticorpos foram capazes de inibir a ligação da proteína viral ao receptor, sendo a citometria de fluxo um método útil para estudar a funcionalidade dos anticorpos em desenvolvimento, a qual pode posteriormente ser confirmada em ensaios de neutralização.

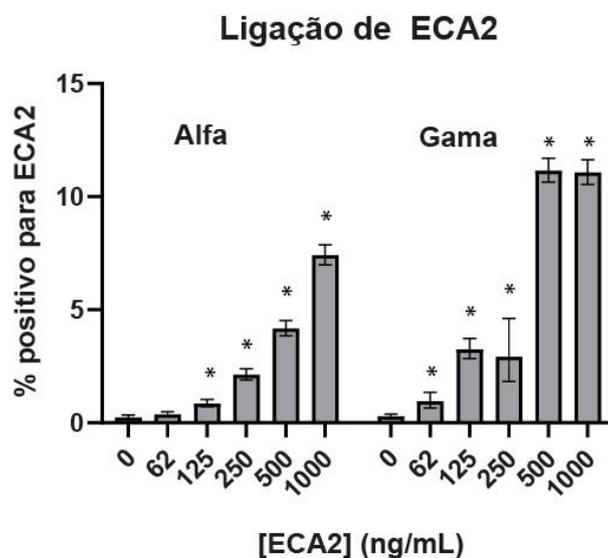
Figura 20 - Ligação dos scFv às proteínas S das variantes Alfa e Gama (A) e inibição da ligação da proteína S da variante Gama pelos scFv



Fonte: Elaborado pela autora. (A) Ligação dos scFvs 3-3, 3-64 e 4-4 à proteína Spike das variantes Alfa e Gama. Células HEK 293F foram transfectadas para expressão das Spikes das variantes Alfa ou Gama e incubadas com scFvs biotinilados. A ligação foi detectada com estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 488. O painel à esquerda é o controle com as células que não foram coradas nem com DAPI nem com scFv + estreptavidina. (B) Bloqueio da ligação de ECA2 à proteína Spike por scFvs. Células HEK 293F transfectadas para expressão da Spike da variante Gama foram incubadas com scFvs não-biotinilados. Em seguida, as células foram incubadas com ECA2 biotinilada e a ligação da ECA2 à Spike detectada com estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 488. O painel da esquerda mostra um controle em que nenhum scFv foi usado para bloquear a interação ECA2-Spike.

No ensaio para otimização da concentração da ECA2 recombinante a ser utilizada nas citometrias de fluxo, foi observado que na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ houve ligação de 4,18% das células transfectadas expressando a variante Alfa e 11,2% das células expressando a variante Gama. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de ECA2 recombinante, os percentuais de ligação foram de 7,42% e 11,1% para as variantes Alfa e Gama, respectivamente (Figura 21). Assim, foi optado por utilizar a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para os ensaios seguintes de citometria de fluxo.

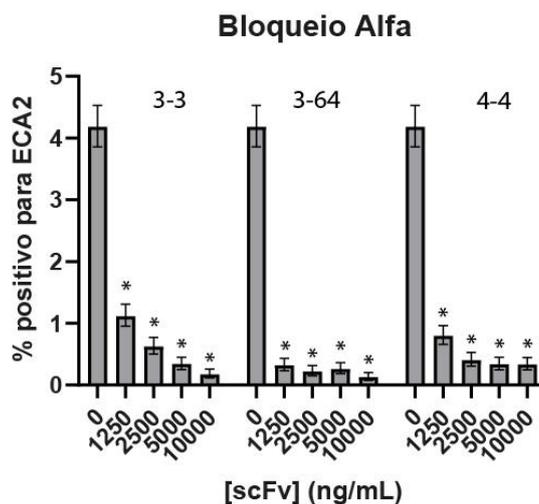
Figura 21 - Gráfico da ligação da proteína ECA2 recombinante às proteínas S das variantes Alfa e Gama, por citometria de fluxo



Fonte: Elaborado pela autora. As barras são a porcentagem de células, e as barras de erro são o intervalo de confiança de 95% (IC95%), calculados pelo método de Wilson/Brown. Os valores de p foram calculados por teste exato de Fisher. Os asteriscos significam $p < 0,0001$.

A seguir, foi realizado ensaio de inibição da ligação entre a ECA2 recombinante e as proteínas S das variantes Alfa e Gama, com titulação dos scFv utilizados.

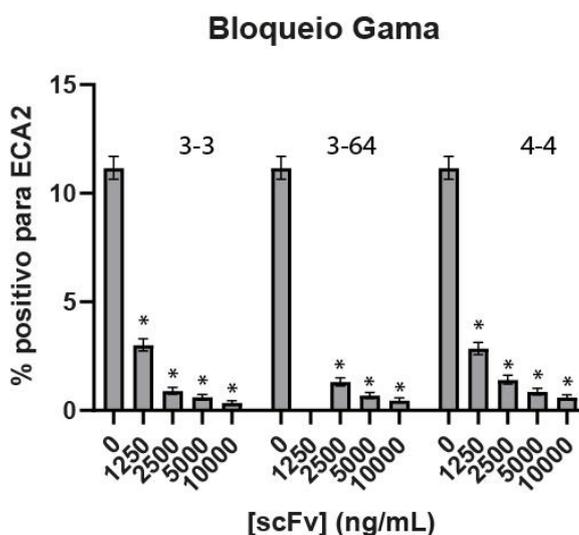
Figura 22 - Gráfico da inibição da ligação da ECA2 recombinante à proteína S da variante Alfa por três clones de scFv



Fonte: Elaborado pela autora. As barras são a porcentagem de células, e as barras de erro são o intervalo de confiança de 95% (IC95%), calculados pelo método de Wilson/Brown. Os valores de p foram calculados por teste exato de Fisher. Os asteriscos significam $p < 0,0001$.

Conforme observado nas figuras Figura 22 e Figura 23, os três clones foram capazes de inibir a interação das proteínas virais com o receptor. Na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$, o clone 3-64 inibiu 93,7% das ligações do receptor com a variante Alfa, seguido do 4-4 e do 3-3 (91,8% ambos). Na interação do receptor com a proteína S da variante Gama, verificou-se inibição de 94,6% das ligações pelo 3-3, 93,9%, pelo 3-64 e 92,3%, pelo 4-4.

Figura 23 - Gráfico da inibição da ligação da ECA2 recombinante à proteína S da variante Gama por três clones de scFv

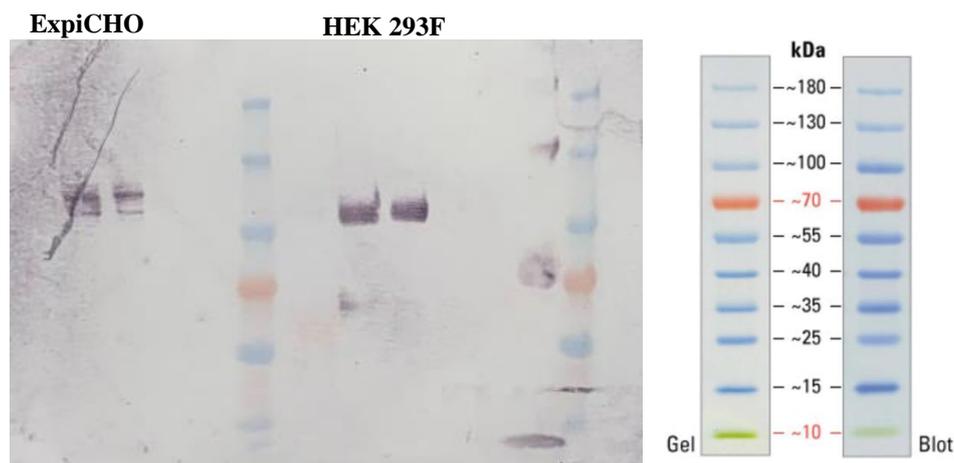


Fonte: Elaborado pela autora. As barras são a porcentagem de células, e as barras de erro são o intervalo de confiança de 95% (IC95%), calculados pelo método de Wilson/Brown. Os valores de p foram calculados por teste exato de Fisher. Os asteriscos significam $p < 0,0001$.

5.4 EXPRESSÃO DA ECA2 RECOMBINANTE EM DIFERENTES CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A fim de se determinar se haveria diferença na produtividade de diferentes linhagens de células de mamíferos, bem como na funcionalidade da proteína expressa, foram utilizadas células Expi-CHO e HEK293F para a produção de um segundo lote de proteína ECA2 recombinante. Após a expressão transiente e a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, foi realizada a quantificação da proteína com o Nanodrop™2000. A concentração mensurada da ECA2 recombinante expressa em ExpiCHO foi de 3,4 mg/mL e a da expressa em HEK 293F foi de 1,8 mg/mL. A validação da expressão e a verificação da pureza da proteína foram realizadas por Western Blot. A Figura 24 mostra uma banda heterogênea de aproximadamente 115kDa para a proteína expressa em ExpiCHO e uma banda homogênea de aproximadamente 110kDa para a expressa em HEK293F. A diferença observada na homogeneidade da banda sugere diferentes padrões de glicosilação.

Figura 24 – Fotografia da membrana de Western Blot da ECA2 recombinante expressa em ExpiCHO e HEK 293F

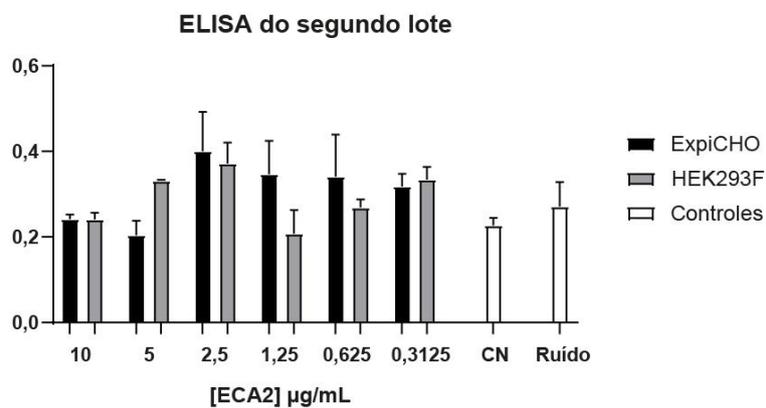


Fonte: Arquivo pessoal e do LabMIB e manual do fabricante disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617?SID=srch-hj-26617>. Acesso em 21 set. 2022. O ensaio de Western Blot foi detectado por anticorpo anti-Histag conjugado a HRP (esquerda) e referência do peso molecular segundo o marcador ThermoScientific™ ref 26617 (direita)

Para verificar se a proteína ECA2 produzida nas duas diferentes linhagens celulares se liga ao RBD da proteína S do SARS-COV-2 original, foi realizado ELISA com diferentes concentrações da proteína (diluição seriada 1:2 iniciando em 10 µg/mL). Tanto a proteína

expressa em ExpiCHO quanto a expressa em HEK293F se ligaram ao RBD do SARS-COV-2 original na concentração de 2,5 µg/mL (Figura 25).

Figura 25 – Gráfico do ELISA de ligação da proteína ECA2 recombinante ao RBD da proteína Spike original



Fonte: Elaborado pela autora. As barras são médias, barras de erro são erro padrão, n=1, logo não há valor de p.

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a produção da ECA2 recombinante expressa de forma transiente em células de mamíferos. A produção foi validada por ensaio de Dot Blot na primeira etapa e, por Western Blot na segunda etapa. A produtividade alcançada no primeiro lote produzido foi de 10,75 µg totais da proteína, numa concentração final de 43 µg/mL. Tal resultado é comparável ao rendimento descrito por Castilho *et al.* (2021). Os autores publicaram a expressão transiente de ECA2 conjugada ao fragmento Fc em *Nicotiana benthamiana* glicoengenheira e relataram produção de 50 µg/g da proteína recombinante. No presente estudo, um segundo lote foi produzido em que a proteína foi expressa em células ExpiCHO e em células HEK293F, também de forma transiente. Nesta etapa, a produtividade foi consideravelmente maior, sendo 510 µg totais para as células ExpiCHO e 270 µg totais para as células HEK293F, numa concentração final de 3,4 mg/mL e 1,8 mg/mL, respectivamente. A diferença entre a produtividade obtida no primeiro e no segundo lote de proteína expressa em células HEK 293F pode ser explicada pelos diferentes momentos de coleta do sobrenadante, os quais foram o 3º dia após a transfecção para o primeiro lote e o 6º dia após a transfecção para o segundo lote. Alta produtividade de proteínas também foi relatada por Hsieh *et al.* (2020) em estudo em que utilizaram vetor de expressão da proteína S otimizado em expressão transiente, tanto em células HEK293 F como células ExpiCHO. No estudo, os autores obtiveram 32,5 mg/mL de proteína S expressa em ExpiCHO e 10,5 mg/mL, em HEK 293F.

Apesar do maior rendimento da expressão da ECA2 em células ExpiCHO, o ensaio de Western Blot mostrou diferença na massa molecular da proteína quando comparado à expressão em células HEK 293F, o que poderia ser devido a mudanças no padrão de glicosilação. Essa diferença também foi relatada por Gstöttner *et al.* (2021) em estudo de caracterização estrutural e funcional de RBD do SARS-CoV-2 expressos em células CHO e células HEK293. A importância da glicosilação, tanto da ECA2 como da proteína S de SARS-CoV- 2, para a modulação da interação entre o vírus e o receptor foi descrita por Zhao *et al.* (2020). Porém, no presente estudo, o ELISA de ligação da ECA2 recombinante ao RBD do SARS-CoV-2 original resultou em similar capacidade de ligação, quando comparadas as proteínas produzidas em células ExpiCHO e em células HEK293F. Este resultado é corroborado pelos achados de Gstöttner *et al.* (2021) que também relataram comparável capacidade de ligação ao receptor do RBD expresso nas diferentes linhagens celulares.

A expressão da ECA2 recombinante em células de mamíferos proposta neste estudo também configurava estratégia de redução de custos para o desenvolvimento dos anticorpos

monoclonais. Ao comparar os resultados do ensaio de ligação da proteína recombinante ao SARS-CoV-2 com o ensaio de ligação de ECA2 comercial, verificou-se maior absorvância na ligação da proteína produzida no estudo, sugerindo melhor capacidade de ligação que da proteína comercial. Portanto, confirmou-se ser a produção da ECA2 recombinante uma ferramenta útil para redução dos custos do amplo Projeto.

Quanto à capacidade de ligação às variantes, o ensaio de citometria de fluxo mostrou que a ECA2 recombinante expressa em células HEK293F manteve sua capacidade de ligação, com um percentual de ligação maior para a variante Gama comparado à variante Alfa. Esse aumento do percentual de ligação pode refletir aumento da afinidade da variante Gama ao receptor celular, demonstrado no estudo de Gobeil *et al.* (2021). Os autores estudaram a estrutura da proteína S das VOC Alfa, Beta, Gama por criomicroscopia eletrônica e constataram que a variante Alfa apresentou a conformação de RBD aberto em aproximadamente 65% das amostras, enquanto essa conformação correspondeu a aproximadamente 88% das observadas para as variantes Beta e Gama. Logo, conforme o relatado, permanece mais acessível nas variantes Beta e Gama, favorecendo a ligação ao receptor. Porém, no mesmo estudo, os autores verificaram menor ligação da ECA2 à variante Gama em relação à variante Alfa, por Ressonância Plasmônica de Superfície. A divergência dos resultados pode ser relacionada a diferença dos métodos utilizados. O estudo computacional de Wozney *et al.* (2022) com simulação molecular também demonstrou menor afinidade ao receptor da variante Gama comparada ao SARS-CoV-2 original, em contraste com o estudo experimental de Starr *et al.* (2020), no qual as mutações observadas na variante Gama, E484K e K417T, foram relacionadas ao aumento de afinidade ao receptor e aumento da expressão do RDB, respectivamente. Apesar dos dados da literatura não apresentarem um consenso quanto ao aumento da afinidade ao receptor em relação às duas variantes, os dados de monitoramento das variantes circulantes mostraram que rapidamente a variante Gama se tornou prevalente no cenário mundial, sugerindo uma vantagem competitiva desta.

Neste contexto, foi realizado ensaio de citometria de fluxo para verificar se o método seria adequado para o teste de inibição da ligação da proteína S da variante Gama ao receptor ECA2 recombinante. Os resultados da citometria de fluxo com 3 amostras de anticorpos desenvolvidos no amplo Projeto mostraram que estes foram capazes de inibir a ligação da ECA2 à variante em diferentes percentuais. Conforme amplamente estudado e comprovado na literatura (HOFFMANN *et al.*, 2021; PLANAS *et al.*, 2021; SHAH; WOO, 2022; WANG *et al.*, 2021), as VOC, especialmente a última declarada pela OMS - a variante Ômicron, possuem graus variados de escape imune aos anticorpos monoclonais aprovados para uso ou em fase de

testes. Logo, constante atualização dos ensaios para as novas variantes serão necessários para avaliação do potencial terapêutico dos mAb. Assim, a citometria de fluxo com a utilização da ECA2 recombinante, conforme descrita neste estudo, mostrou ser um método útil para o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais.

Além disso, outras possibilidades de aplicações da ECA2 recombinante na forma solúvel têm sido descritas na literatura. Sims *et al.* (2021), descreveram o uso terapêutico de ECA2 recombinante solúvel, modificada para aumentar sua afinidade à proteína viral, como inibidor da interação do vírus ao receptor na membrana celular, para aplicação intranasal. Em 2022, os mesmos autores publicaram que a proteína desenvolvida para o estudo anterior mantinha sua capacidade de ligação à nova variante Ômicron com afinidade nanomolar, mostrando a vantagem estratégica do uso de ECA2 solúvel para neutralização de variantes emergentes em relação a alguns anticorpos monoclonais (SIMS *et al.*, 2022). Mamedov *et al.* (2021) também descreveram a produção de ECA2 recombinante humana solúvel com capacidade inibitória da interação do SARS-CoV-2 ao receptor de membrana, com IC₅₀ de 1 µg/mL, demonstrando potencial terapêutico. E ainda, Monteil *et al.* (2022) comprovaram que a ECA2 APN010, atualmente em fase de estudo clínico (NCT04335136), apresenta maior afinidade na ligação tanto ao RBD quanto à proteína S de todas as variantes em relação ao SARS-CoV-2, bem como manteve sua capacidade de neutralização destas. Por fim, além do uso terapêutico da ECA2 solúvel, esta pode ser otimizada e adaptada para fins diagnósticos, uma vez que o SARS-CoV-2 tende a evoluir com mutações capazes de aumentar sua afinidade de ligação ao receptor.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, o presente estudo mostrou que a produção da ECA2 recombinante na forma solúvel é um processo útil e viável para a sua aplicação em projetos de desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra o SARS-CoV-2. A expressão da proteína recombinante em células de mamíferos apresentou boa produtividade, configurando assim ser uma estratégia de redução de custos. Apesar da diferença na glicosilação das proteínas recombinantes expressas em células CHO e células HEK293, não ficou evidenciada diferença na capacidade de ligação dessas à proteína viral. E, ainda, sua utilização em ensaios de inibição da interação da proteína viral com o receptor por anticorpos foi possível, atingindo assim o objetivo final no amplo Projeto. O presente estudo abre possibilidades de novas aplicações da ECA2 recombinante solúvel expressa em células de mamíferos nas pesquisas do grupo do LabMIB e de parcerias com outros grupos de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ADDGENE. Addgene's repository. Plasmid #154101. Disponível em: <<https://www.addgene.org/154101/>>. Acesso em 19 de set. de 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Coronavírus, medicamentos. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>>. Acesso em: 21 de set.de 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Coronavírus, autotestes. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/autotestes>>. Acesso em: 21 de set.de 2022.
- ALHARBI, N. K. *et al.* Development and Evaluation of Enzyme-Linked Viral Immune Capture Assay for Detection of SARS-CoV-2. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. August, p. 1–7, 2022.
- BLOCH, E. M. *et al.* Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 130, n. 6, p. 2757–2765, 2020.
- BURATTO, D. *et al.* Rapid Assessment of Binding Affinity of SARS-COV-2 Spike Protein to the Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor and to Neutralizing Biomolecules Based on Computer Simulations. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. November, p. 1–12, 2021.
- CASTILHO, A. *et al.* Generation of enzymatically competent SARS-CoV-2 decoy receptor ACE2-Fc in glycoengineered *Nicotiana benthamiana*. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1–6, 2021.
- CHAN, K. K. *et al.* Engineering human ACE2 to optimize binding to spike protein of SARS coronavirus 2. **Science**, v. 369, n. 6508, p1261-1265, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.abc0870>>.
- CHEN, C. *et al.* Computational prediction of the effect of amino acid changes on the binding affinity between SARS-CoV-2 spike RBD and human ACE2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 118, n. 42, 2021.
- CORTI, D. *et al.* Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 12, p. 3086–3108, 2021.
- DUAN, K. *et al.* Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 17, p. 9490–9496, 2020. Disponível em: <https://osf.io/gahz5>.
- FDA. Food and Drug Administration. COVID-19, test basics. Disponível em: <<https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/covid-19-test-basics>> Acesso em 21 de set. de 2022.
- GOBEIL, S. M. C. *et al.* Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. **Science**, [s. l.], v. 373, n. 6555, 2021.

GSTÖTTNER, C. *et al.* Structural and Functional Characterization of SARS-CoV-2 RBD Domains Produced in Mammalian Cells. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 93, n. 17, p. 6839–6847, 2021.

HATMAL, M. M. *et al.* Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2020.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 2020.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 9, p. 2384-2393.e12, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421003676>.

HSIEH, C. *et al.* Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. [s. l.], v. 0826, n. July, p. 1–9, 2020.

JIANG, W. *et al.* Characterization of MW06, a human monoclonal antibody with cross-neutralization activity against both SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **mAbs**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1953683>.

JOYNER, M. J. *et al.* Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5,000 patients. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 2, n. of 36, p. 0–24, 2020.

JU, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. **Nature**, [s. l.], v. 584, n. 7819, p. 115–119, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2380-z>.

KANG, T. H.; SEONG, B. L. Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. September, p. 1–10, 2020.

KIM, S.; LEE, J. H. Current Advances in Paper-Based Biosensor Technologies for Rapid COVID-19 Diagnosis. **Biochip Journal**, [s. l.], n. 0123456789, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13206-022-00078-9>.

KUHN, J. H. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2: A functional receptor for SARS coronavirus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 61, n. 21, p. 2738–2743, 2004.

KUMAWAT, N. *et al.* Site Density Functional Theory and Structural Bioinformatics Analysis of the SARS-CoV Spike Protein and hACE2 Complex. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 1–19, 2022.

LARKEY, N. E. *et al.* Limited Correlation between SARS-CoV-2 Serologic Assays for Identification of High-Titer COVID-19 Convalescent Plasma Using FDA Thresholds. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–9, 2022. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.01154-22>.

LIU, L. *et al.* Potent neutralizing antibodies directed to multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. **Nature**, [s. l.], 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>.

MAIR-JENKINS, J. *et al.* The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: A systematic review and exploratory meta-analysis. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 211, n. 1, p. 80–90, 2015.

MAMEDOV, T. *et al.* Soluble Human Angiotensin- Converting Enzyme 2 as a Potential Therapeutic Tool for COVID-19 is Produced at High Levels In *Nicotiana benthamiana* Plant With Potent Anti-SARS-CoV-2 Activity. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, n. December, p. 1–14, 2021.

MONTEIL, V. *et al.* Clinical grade ACE2 as a universal agent to block SARS-CoV -2 variants . **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 1–13, 2022.

NEXTSTRAIN: Real-time tracking of pathogen evolution, c2015-2022. Disponível em: <https://nextstrain.org/ncov/open/global/all-time>. Acesso em 21 de set. de 2022.

PANGO LINEAGES: Latest epidemiological lineages of SARS-CoV-2. Disponível em: https://cov-lineages.org/lineage_html. Acesso em : 21 de set. de 2022.

PINTO, D. *et al.* **Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody**. [S. l.: s. n.], 2020.

PLANAS, D. *et al.* Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. **Nature**, [s. l.], v. 596, n. 7871, p. 276–280, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03777-9>.

QIAN, Z. *et al.* The efficiency of convalescent plasma in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, n. July, p. 1–14, 2022.

QU, K. *et al.* Engineered disulfide reveals structural dynamics of locked SARS-CoV-2 spike. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. e1010583, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010583>.

RAI, P. *et al.* Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 441–455, 2021.

RAZUMIKHIN, M. *et al.* Development and characterization of anti-SARS-CoV-2 intravenous immunoglobulin from COVID-19 convalescent plasma. **Immunotherapy**, [s. l.], 2022.

ROBBIANI, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature**, [s. l.], 2020.

ROTONDO, J. C. *et al.* Advanced Molecular and Immunological Diagnostic Methods to Detect SARS-CoV-2 Infection. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–22, 2022.

ROTONDO, J. C. *et al.* **Sars-cov-2 infection: New molecular, phylogenetic, and pathogenetic insights. efficacy of current vaccines and the potential risk of variants.** [*S. l.: s. n.*], 2021-. ISSN 19994915.v. 13

SALLEH, M. Z.; DERRICK, J. P.; DERIS, Z. Z. Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 22, n. 14, 2021.

SCIALO, F. *et al.* ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. **Lung**, [*s. l.*], v. 198, n. 6, p. 867–877, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>.

SENEFELD, J. W. *et al.* Access to and safety of COVID-19 convalescent plasma in the United States Expanded Access Program: A national registry study. **PLoS Medicine**, [*s. l.*], v. 18, n. 12, p. 1–28, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003872>.

SHAH, M.; WOO, H. G. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 12, n. January, p. 1–10, 2022.

SHANG, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*s. l.*], v. 117, n. 21, 2020.

SHEPARD, H. M. *et al.* Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, [*s. l.*], v. 17, n. 3, p. 220–232, 2017.

SIMS, J. J. *et al.* High activity of an affinity-matured ACE2 decoy against Omicron SARS-CoV-2 and pre-emergent coronaviruses. **Plos One**, [*s. l.*], v. 17, n. 8, p. e0271359, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0271359>.

SIMS, J. J. *et al.* Intranasal gene therapy to prevent infection by SARS-CoV-2 variants. **PLoS Pathogens**, [*s. l.*], v. 17, n. 7, p. 1–23, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009544>.

STARR, T. N. *et al.* Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. **Cell**, [*s. l.*], v. 182, n. 5, p. 1295–1310.e20, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>.

TAI, W. *et al.* Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. **Antiviral Research**, [*s. l.*], n. January, 2020.

THE ANTIBODY SOCIETY: An international non-profit supporting antibody-related research and development, c2015. Homepage. Disponível em: <[COVID-19 Biologics Tracker - The Antibody Society](#)>. Acesso em: 21 de set. de 2022.

THERMO FISCHER. Scientific. Catalog, product, number 26617. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617?SID=srch-hj-26617>>. Acesso em 21 de set. de 2022.

WALLS, A. C. *et al.* Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-. **Cell**, [s. l.], v. 180, n. January, p. 281–292, 2020.

WANG, C. *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–6, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16256-y>.

WANG, P. *et al.* Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. **Nature**, [s. l.], v. 593, n. 7857, p. 130–135, 2021. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03398-2>.

WANG, Y. *et al.* Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32634129>.

WHO. World Health Organization, 2022. Homepage. Disponível em: <[Coronavirus disease \(COVID-19\) \(who.int\)](https://www.who.int)>. Acesso em: 21 de set. de 2022.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 324, n. 8, p. 782–793, 2020.

WOZNEY, A. J. *et al.* **Evolution of Stronger SARS-CoV-2 Variants as Revealed Through the Lens of Molecular Dynamics Simulations**. [S. l.: s. n.], 2022.

WRAPP, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, [s. l.], v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

WU, S. *et al.* Comparison of the Performance of 24 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Assays in the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 Patients. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. August, p. 1–8, 2022.

YAMADA, T. Therapeutic Monoclonal Antibodies. **Keio J Med**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 37–46, 2011.

YUAN, M. *et al.* Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. **Science**, v. 373, n. 6556, p 818-823, 2021. Disponível em:<<https://doi.org/10.1126/science.abh1139>>.

ZHAO, P. *et al.* Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 586-601.e6, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312820304571>.

ZHENG, Z. *et al.* Monoclonal antibodies for the S2 subunit of spike of SARS-CoV-1 cross-react with the newly-emerged SARS-CoV-2. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, [s. l.], v. 25, n. 28, p. 19–28, 2020.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat

origin. **Nature**, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

ZHU, C. *et al.* Molecular biology of the SARs-CoV-2 spike protein: A review of current knowledge. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 93, n. 10, p. 5729–5741, 2021.

ZOST, S. J. *et al.* **Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2.** [S. l.: s. n.], 2020. v. 584

ZOST, S. J. *et al.* Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 1422–1427, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0998-x>.