



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Lucas Silva Rodrigues

Expressão e Caracterização de Fragmentos de Anticorpos Contra o Peptídeo de Fusão do SARS-CoV-2

2024



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Lucas Silva Rodrigues

Expressão e Caracterização de Fragmentos de Anticorpos Contra o Peptídeo de Fusão do SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre (a) em Patologia Molecular.

Orientador: Marcelo de Macedo Brígido
Coorientadora: Andrea Queiroz Maranhão

Lucas Silva Rodrigues

Expressão e Caracterização de Fragmentos de Anticorpos Contra o Peptídeo de Fusão do SARS-CoV-2

Trabalho desenvolvido no laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo de Macedo Brígido	Presidente da banca
Dr. Gilvan Pessoa Furtado	Membro titular
Dr. Jaime Martins de Santana	Membro titular
Dra. Isabel Sousa	Membro suplente

“Eu sei o que devo fazer agora, eu tenho que continuar respirando, porque amanhã o Sol vai nascer, e quem sabe o que a maré vai me trazer?”
Chuck Noland, do filme Náufrago.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder a graça e força necessária para trilhar esses 2 anos de muitos experimentos. Foi uma longa jornada até aqui, e finalmente vejo a linha de chegada.

A minha família que sempre fizeram o melhor que puderam, especialmente minha mãe Maria Aparecida que me criou. Aos meus avós Maria Natividade e Raimundo que sempre apoiam minha mãe na minha criação e nunca deixaram faltar o mantimento. Ao meu irmão Matheus que foi meu companheiro de peregrinação nesses anos de UnB. Agradeço pelo companheirismo no tempo das vacas magras, quando tínhamos que pedir por favor até para andar de ônibus.

A minha noiva Beatriz Neri Nascimento, por todo amor e carinho nesses 2 anos de relacionamento. Muito obrigado por sempre enxergar o melhor de mim, e sempre compreender minhas loucuras.

Ao Professor Marcelo que me acolheu em seu laboratório desde a iniciação científica. Sua orientação foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico. A Professora Andrea Maranhão que também me orientou ao longo dos últimos 6 anos no laboratório 1. Suas perguntas nas reuniões semanais sempre me assustavam, mas me ajudaram a desenvolver minha capacidade de compreender artigos científicos complexos.

Ao meu colega de laboratório, que auxiliou muitíssimo nos experimentos Renato Kaylan. Aos colegas de laboratório que tornaram o laboratório 1 o mais divertido, Ana Clara Antonelli, Luis Silva, Dayane Prado e Sylvia Pianhate. Aos alunos de IC mais dedicados de todos os tempos, Maria Clara, Pietra e Renato Oliveira.

Aos diferentes professores e alunos que me ajudaram nos experimentos com dicas e protocolos.

Por último mas não menos importante, eu quero agradecer a mim mesmo por todo esse trabalho duro, por todos os dias trabalhados, por todas as repetições de ELISA até alcançar o sucesso. Foi uma longa estrada até aqui, mas essa é a jornada do herói, parte da jornada é o fim. Quem sabe o que virá a seguir?

Ao CNPq, CAPES, FAP-DF e FINATEC pelo apoio financeiro.

RESUMO

No final de 2019 um novo coronavírus capaz de infectar humanos foi identificado: o SARS-CoV-2, que é o agente etiológico da COVID-19. O SARS-CoV-2 rapidamente se espalhou por todo o mundo causando uma pandemia mundial, com consequências sociais e econômicas desastrosas. O SARS-CoV-2 utiliza a Enzima conversora de Angiotensina 2 (ACE2) como receptor celular. A Proteína S do SARS-CoV-2, formada por um trímero onde cada monômero possui cerca de 180 kDa, é responsável por mediar a ligação com o ACE2 e assim a entrada do vírus na célula. A Proteína S é composta por duas subunidades, denominadas S1 e S2. Na subunidade S1 está presente o RBD (do inglês *Receptor Binding Domain*) que é a parte da glicoproteína que interage diretamente com o receptor celular. Na subunidade S2 está o sítio de clivagem S2' e imediatamente após esse sítio, está a região do Peptídeo de Fusão (FP), que juntamente com o sítio S2' auxilia na entrada do vírus na célula hospedeira. Durante a pandemia foram desenvolvidas anticorpos monoclonais terapêuticos que tinham como alvo a proteína S do SARS-CoV-2, especialmente o RBD, com o intuito de bloquear a entrada do vírus na célula hospedeira por meio do bloqueio da interação entre a Proteína S e o receptor celular. Entretanto, variantes do SARS-CoV-2 surgiram e acumularam mutações na Proteína S e principalmente no RBD, que assim reduziram a eficácia dos anticorpos contra essa região. Neste trabalho, relatamos o desenvolvimento de dois fragmentos de anticorpos a partir de uma biblioteca combinatória em fagos, reativos com o FP do SARS-CoV-2, que diferentemente do RBD, se manteve extremamente conservada mesmo entre as variantes do SARS-CoV-2. Demonstramos a capacidade desses fragmentos de anticorpos, no formato scFv, de se ligarem a Proteína S das variantes Gama e Delta e também ao vírus original de Wuhan. Esses novos anticorpos podem agora serem testados como alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções pelo SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Coronavírus; Covid-19; scFv; Anticorpos Neutralizantes; Phage Display

ABSTRACT

At the end of 2019, a new coronavirus capable of infecting humans was identified: SARS-CoV-2, which is the etiological agent of COVID-19. SARS-CoV-2 quickly spread throughout the world, causing a global pandemic, with disastrous social and economic consequences. SARS-CoV-2 uses Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) as a cellular receptor. The SARS-CoV-2 Protein S, formed by a trimer where each monomer is around 180 kDa, is responsible for mediating the connection with ACE2 and thus the entry of the virus into the cell. Protein S is composed of two subunits, called S1 and S2. The S1 subunit contains the RBD (Receptor Binding Domain), which is the part of the glycoprotein that interacts directly with the cellular receptor. In the S2 subunit there is the S2' cleavage site and immediately after this site is the Fusion Peptide (FP) region, which together with the S2' site assists in the entry of the virus into the host cell. During the pandemic, therapeutic monoclonal antibodies were developed that targeted the S protein of SARS-CoV-2, especially RBD, with the aim of blocking the entry of the virus into the host cell by blocking the interaction between the S protein and the cellular receptor. However, variants of SARS-CoV-2 emerged and accumulated mutations in Protein S and mainly in the RBD, which reduced the effectiveness of antibodies against this region. In this work, we report the development of two antibody fragments from a combinatorial phage library, reactive with the FP of SARS-CoV-2, which, unlike the RBD, remained extremely conserved even among the SARS-CoV-2 variants. We demonstrated the ability of these antibody fragments, in scFv format, to bind to Protein S of the Gamma and Delta variants and also to the original Wuhan virus. These new antibodies are now being tested as therapeutic alternatives for treating SARS-CoV-2 infections.

Key words: Coronavirus; Covid-19; scFv; Neutralizing Antibodies; Phage Display

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Origem animal dos Coronavírus	2
Figura 2. A estrutura do SARS-CoV-2 e seu genoma	3
Figura 3. Estrutura da Glicoproteína do SARS-CoV-2	4
Figura 4. Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 por via Endossomal.	6
Figura 5. Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 pela membrana celular.	7
Figura 6. Mapa mundial ilustrando os anos e os países afetados pelos diferentes VOCs do SARS-CoV-2	9
Figura 7. Representação das substituições de aminoácidos na proteína S da variante Omicron	10
Figura 8. Estrutura de uma molécula de anticorpo	13
Figura 9. Etapa da Sinapse na recombinação V(D)J	14
Figura 10. Demais etapas da recombinação V(D)J	15
Figura 11. Desenvolvimento de anticorpos, de murino a completamente humano	16
Figura 12. Número de anticorpos terapêuticos aprovados nos Estados Unidos e Europa	18
Figura 13. Diferentes formatos de Fragmentos de anticorpos comparados a IgG	20
Figura 14. Representação do processo de seleção de anticorpos por Phage Display	26
Figura 15. Cassete de expressão do Fab no vetor pComb3XSSFab.	36
Figura 16. Alinhamento da região do Sítio de Clivagem S2' em diferentes coronavírus	47
Figura 17. Estrutura tridimensional da Proteína S	48
Figura 18. Alinhamento do peptídeo mimético com a região do Peptídeo de Fusão	49
Figura 19. Estrutura tridimensional do Peptídeo de Fusão mimético	50
Figura 20. Amplificação dos domínios variáveis VH e VL	53
Figura 21(a). Mapa do vetor de expressão pET-SUMO contendo os genes dos anticorpos scFv Acp e Aca	55
Figura 21(b). Análise da clonagem de genes de anticorpos recombinantes para o vetor de expressão pet-sumo	55
Figura 22(a). SDS-Page da padronização da expressão do scFv Aca na linhagem <i>Shuffle pLysY</i>	56
Figura 22(b) - Western blot da padronização da expressão do scFv Aca na linhagem <i>Shuffle pLysY</i>	56
Figura 23. Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel do Anticorpo Aca	57
Figura 24. SDS-Page da Purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA.	58
Figura 25. Western blot da purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-ha	59

Figura 26. Western blot da purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA detecção com Anti-his	60
Figura 27. Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel do Anticorpo Acp no Akta Pure	61
Figura 28. SDS-Page da Purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA	62
Figura 29. Western blot da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-his	62
Figura 30. Western blot da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-ha	63
Figura 31. Ligação dos fragmentos de anticorpos ao Peptídeo Mimético.	64
Figura 32. Ligação dos fragmentos de anticorpos à Proteína S da variante Gama	65
Figura 33. Ligação dos fragmentos de anticorpos à Proteína S da variante Delta.	66
Figura 34. Ligação dos scFvs Aca e Acp ao vírus SARS-CoV-2 inativado (vírus de Wuhan)	67
Figura 35. SDS-Page e Western blot da da purificação da SUMO protease no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA	68
Figura 36. SDS-Page e Western blot da digestão do anticorpo Acp com a SUMO protease	68
Figura 37. Western blot da digestão do anticorpo Acp com a SUMO protease	69
Figura 38. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do Anticorpo Acp.	71
Figura 39. Western blot e gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes da da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando a coluna coluna Superdex 200 10/300 GL.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos Terapêuticos contra doenças infecciosas	18
Tabela 2. Lista de anticorpos monoclonais aprovados para tratamento ou profilaxia da COVID-19.	21
Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do VH e VL	35
Tabela 4. Titulação dos fagos	52
Tabela 5. Análise do sequenciamento Illumina no ATTILA	54
Tabela 6. Quantificação da expressão dos scFvs	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADE	Antibody dependent enhancement
AP	Fosfatase Alcalina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	DNA complementar
CDR	Regiões Determinante de Complementaridade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunodeteção enzimática
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
g	Força gravitacional
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NBT	Nitro-azul-tetrazólio
D.O	Densidade óptica
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
pb	Par de Base
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
scFv	Fragmento variável de cadeia única
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TB	Meio de cultura Terrific Broth
TBS	Salina tamponada com Tris

U	Unidade enzimática
---	--------------------

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Origem do SARS-CoV-2	1
1.1.1 A Partícula Viral do SARS-CoV-2	3
1.1.2 A infecção pelo SARS-CoV-2	5
1.1.3 As variantes do SARS-CoV-2	8
1.2 Anticorpos	11
1.3 Anticorpos Monoclonais	15
1.4 Anticorpos Terapêuticos	17
1.5 Anticorpos Monoclonais contra o SARS-CoV-2	21
1.6 O Phage Display	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	79
8. REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Origem do SARS-CoV-2

No final do ano de 2019, um novo coronavírus foi detectado na província de Wuhan na China (JAHANSHAHLU, *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus da família dos coronavírus responsável pela recente pandemia da doença do coronavírus, denominada como COVID-19. Anteriormente, sete outros coronavírus pertencentes ao mesmo grupo filogenético foram capazes de infectar humanos, e dois deles causaram epidemias regionais, são eles o SARS-CoV e o MERS-CoV.

Existem quatro gêneros de coronavírus, Alfa, Beta, Delta e Gama coronavírus. Os coronavírus SARS-CoV, o MERS-CoV e o SARS-CoV-2 pertencem ao gênero Beta e esse subgrupo de coronavírus é chamado Sarbecoronavírus. Esse grupo de coronavírus juntamente com os alfacoronavírus são abundantes entre morcegos e outros mamíferos. Enquanto que os Gamacoronavírus e o Deltacoronavírus são encontrados principalmente em aves. O SARS-CoV saltou a barreira para humanos na província de Guangdong na China em dois eventos distintos entre 2002 e 2003. Ambos os eventos estavam associados a mercados que comercializam animais vivos, sendo que provavelmente o vírus saltou a barreira entre espécies de civetas para humanos. O SARS-CoV e o SARS-CoV-2 possuem uma grande semelhança genética entre si. Na região da Proteína S a identidade na sequência de aminoácidos é de 77,5%.

Em 2012, ocorreu o surto da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, causada pelo MERS-CoV, o qual pertence à linhagem C dos Betacoronavírus. Foi sugerido que o MERS-CoV surgiu de morcegos, entretanto o reservatório que levou ao salto entre espécies para humanos provavelmente foram dromedários. O MERS-CoV utiliza a dipeptidil-peptidase 4 (DPP4) como receptor celular e infecta células epiteliais brônquicas não ciliadas e pneumócitos tipo II (CUI, *et al.*, 2019).

Há outros coronavírus que já causaram infecções em humanos, são eles: coronavírus OC43, (HCoV-OC43), o coronavírus-HKU1 (HCoV-HKU1), o coronavírus 229E (HCoV-229E) e o coronavírus NL63 (HCoVNL63) (HOLMES, *et al.*, 2021). Esses coronavírus, na maioria dos casos, apenas causam doenças respiratórias leves, mas podem causar doenças mais graves em bebês e idosos. Até o momento, todos os coronavírus que infectam humanos possuem origem em outros animais (Figura 1).

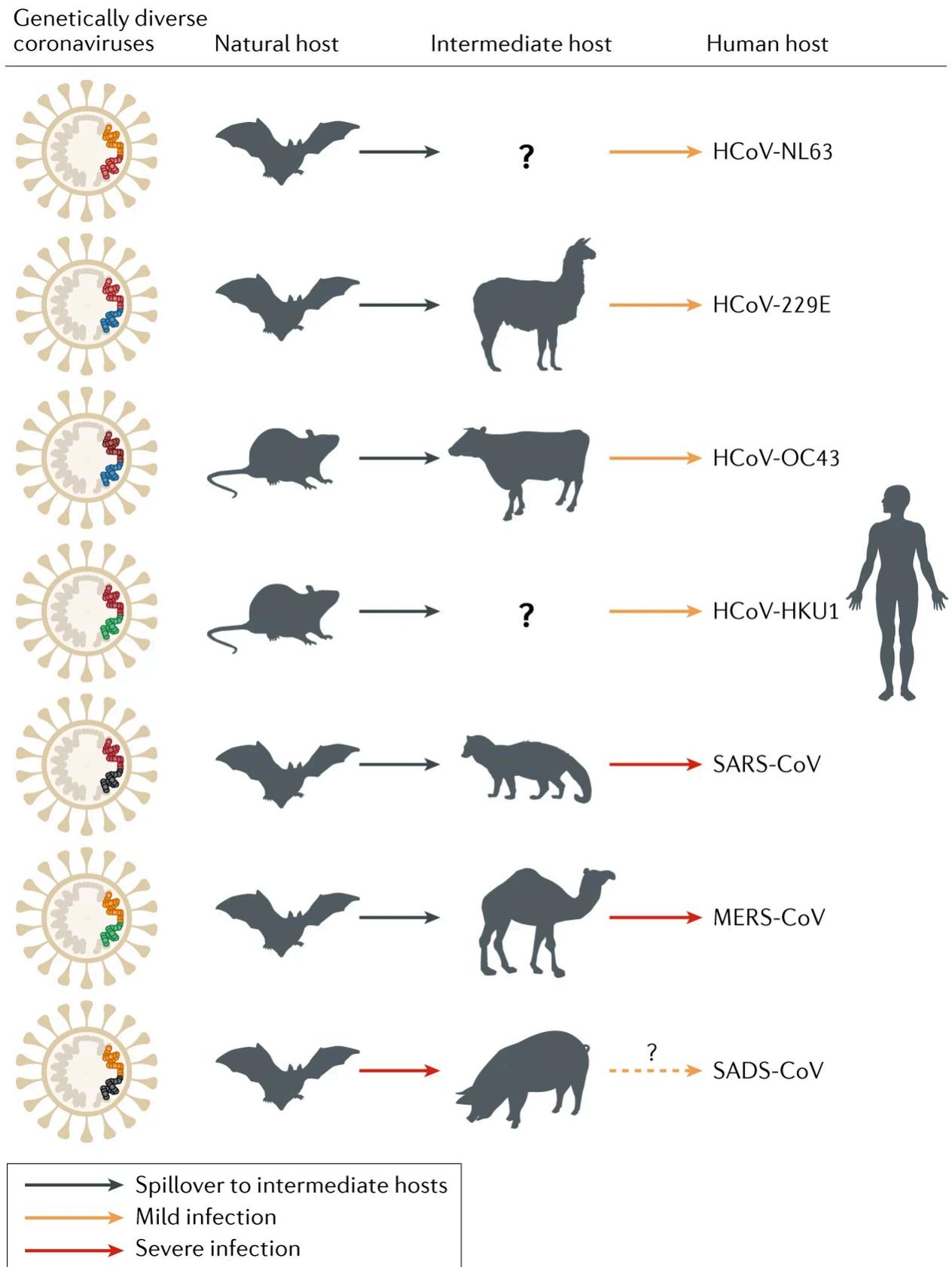


Figura 1. Origem animal dos Coronavírus. Considera-se que SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63 e HCoV-229E tiveram origem em morcegos; HCoV-OC43 e HKU1 provavelmente se originaram de

roedores. Adaptado de CUI, *et al.*, 2019.

Análises do genoma do SARS-CoV-2 demonstraram que o mesmo possui uma identidade nucleotídica de cerca de 79,5% com o SARS-CoV e que o SARS-CoV-2 é filogeneticamente próximo ao coronavírus RaTG13 que foi previamente isolado de morcegos na província de Yunnan na china, em 2013. A cepa RaTG13 possui uma identidade genômica de cerca de 96% com o SARS-CoV-2 o que poderia indicar uma proximidade entre essas cepas virais, corroborando a possível origem zoonótica do SARS-CoV-2. Entretanto, o hospedeiro intermediário ainda não é conhecido.

1.1.1 A Partícula Viral do SARS-CoV-2

O genoma do SARS-CoV-2 é constituído por uma fita simples de RNA de senso positivo, a qual possui por volta de 30 mil pares de bases. o genoma do vírus codifica as quatro proteínas estruturais do vírus, a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína de membrana (M), a glicoproteína de espícula (S) e a proteína do envelope (E) (figura 2). A molécula de RNA é armazenada dentro do capsídeo em associação à proteína N, a qual é empacotada pelo envelope. Na superfície da partícula viral se projeta a Proteína S que medeia a ligação ao receptor celular ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2).

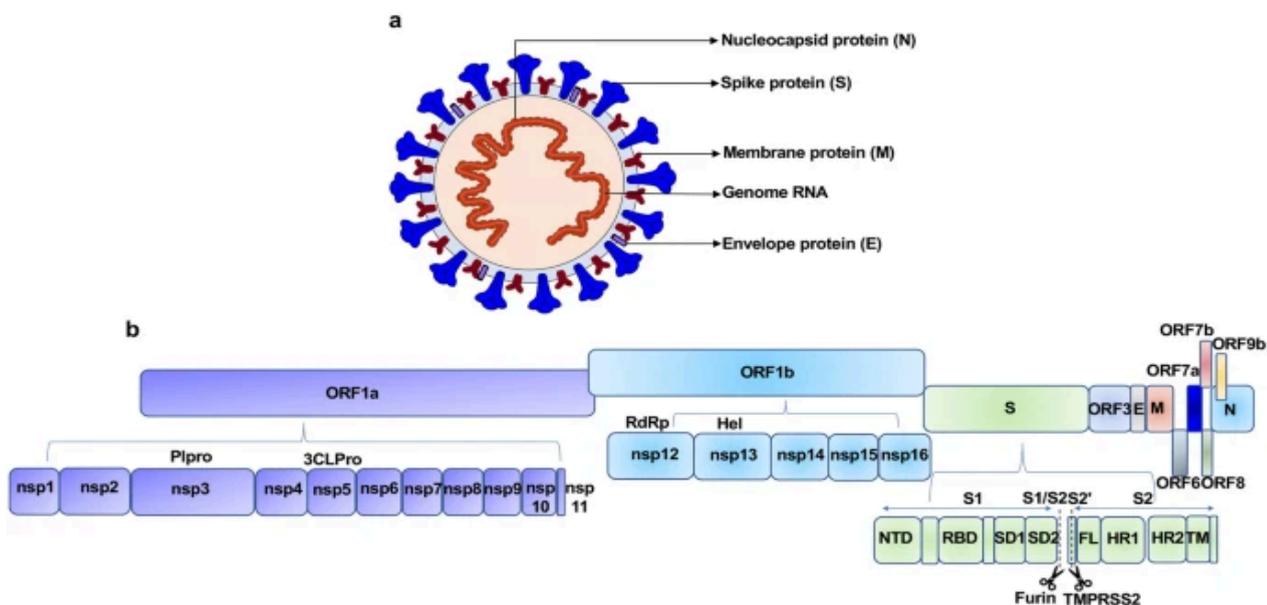


Figura 2. A estrutura do SARS-CoV-2 e seu genoma. (a) As proteínas estruturais da partícula viral N, S, M e E. (b) O genoma viral com as fases de leitura e as NSPs geradas. Adaptado de Zhang *et al.*, 2021.

Além das quatro proteínas estruturais do vírus, o genoma também codifica outras 16 proteínas não estruturais (NSP) que auxiliam na replicação do vírus. A NSP 12 contém a

RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é uma RNA polimerase dependente de RNA que atua tanto na replicação quanto na transcrição dos genes. O complexo de replicação do vírus é formado por várias subunidades formadas pelas NSP 7 e NSP 8 associadas a RdRp presente na NSP 12 (WANG, *et al.*, 2020; HILLEN, *et al.*, 2020)

A Proteína S do SARS-CoV-2 é responsável por mediar a ligação com o receptor celular e a posterior entrada do vírus na célula (OU, *et al.*, 2020). A Proteína S é formada por um trímero onde cada monômero possui cerca de 180 kDa. A Proteína S é composta por duas subunidades, denominadas S1 e S2, onde cada subunidade contém 90 kDa (Figura 3).

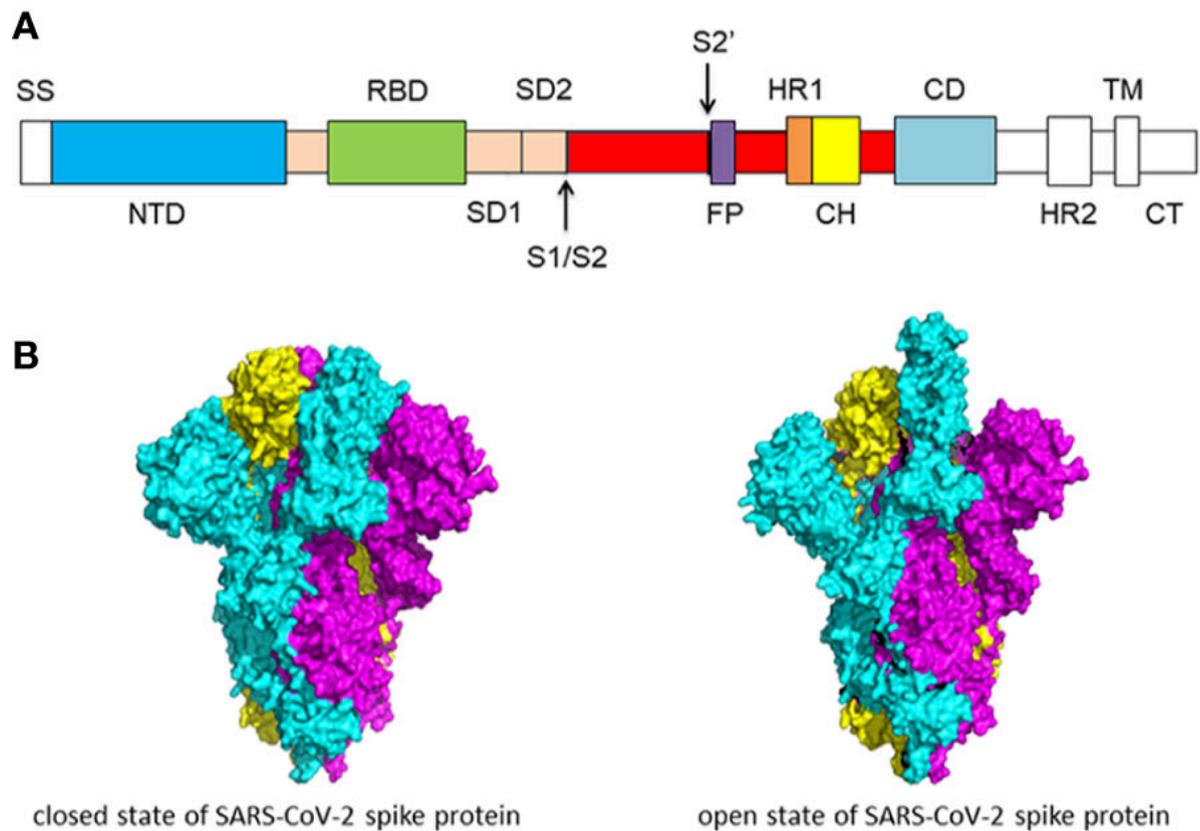


Figura 3. Estrutura da Glicoproteína do SARS-CoV-2. (a) Organização das subunidades S1 e S2 com os diferentes domínios separados por cores. (b) Estrutura tridimensional do trímero da Proteína S nos estados fechado (PDB: 6VXX) e aberto (PDB: 6VYB). Adaptado de WANG, *et al.*, 2020.

Na subunidade S1 está presente o RBD (do inglês *Receptor Binding Domain*) que é a parte da glicoproteína que interage diretamente com o receptor celular, o ACE 2. Entre as duas subunidades há um sítio de clivagem denominado S1/S2 que necessita ser clivado para a formação da partícula viral madura. Enquanto que na subunidade S2 há outro sítio de clivagem chamado de S2' que é sucedido pela região do Peptídeo de Fusão (FP). A clivagem deste sítio é necessária para a fusão da membrana da partícula viral com a membrana celular.

Quando ocorre a clivagem do sítio S2' é desencadeado uma série de mudanças conformacionais que culminaram na fusão das membranas do vírus e da célula. Portanto a subunidade S1 medeia a ligação da partícula viral à célula do hospedeiro enquanto que a subunidade S2 participa da fusão da membrana do vírus com a membrana celular.

Na subunidade S2 também estão presentes outras regiões importantes como a região hiper-repetitiva 1 e 2 (HR1 e HR2) e o domínio transmembrânico (TC). As regiões HR1 e HR2 também auxiliam na formação do núcleo de fusão, o que já foi confirmado pela cristalografia da estrutura tridimensional da Proteína S (XU, *et al.*, 2004).

1.1.2 A infecção pelo SARS-CoV-2

A glicoproteína de espícula (S) é fundamental para a entrada do vírus na célula do hospedeiro. Assim como o SARS-CoV, o SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor celular. A ACE2 é expressa no pulmão, no miocárdio, em células do endotélio, na mucosa gastrointestinal e nos rins. A enzima ACE2 é uma carboxipeptidase que remove um aminoácido da extremidade carboxiterminal do seu substrato. A função da ACE2 está relacionada à regulação arterial no sistema Renina-Angiotensina.

O ACE2 converte a angiotensina I e II em angiotensina (1-9) e angiotensina (1-7), levando a vasodilatação, portanto sua ação auxilia na regulação da pressão sanguínea. O gene que codifica a ACE2 é mais expresso em pacientes com doenças crônicas como a hipertensão, o que poderia explicar o desenvolvimento de casos mais graves de COVID-19 nessas pessoas (KO, *et al.*, 2020).

No RBD, a parte da proteína S que interage diretamente com o ACE2, há duas subdomínios, sendo uma delas denominada motivo de ligação ao receptor (RBM), que faz todos os contatos com ACE2. Dezesete resíduos de aminoácido do RBD interagem por meio de ligações hidrofílicas com 20 resíduos do ACE2. O aminoácido Lisina na posição 417 no RBD forma uma ponte salina com o aminoácido Aspartato na posição 30 do ACE2.

Para a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira ocorrer, uma série de mudanças conformacionais na Proteína S são necessárias. Após a ligação do RBD ao ACE2, é necessário que a Proteína S sofra clivagens proteolíticas em 2 sítios. O primeiro deles, o sítio S1/S2 é clivado por furinas no momento em que o vírus sai da célula que o produziu. Já o

sítio S2' é clivado por proteases da célula alvo.

Há duas principais proteases envolvidas na clivagem da Proteína S, a TMPRSS2 (Protease Serina Transmembranar 2) e a Catepsina L. Enquanto a TMPRSS2 está presente na superfície celular e realiza a ativação da Proteína S na membrana plasmática, a Catepsina realiza a ativação na partícula endocítica. No momento em que ocorre a ligação do vírus ao ACE2 ocorrem mudanças conformacionais na subunidade S1 que vão levar à exposição do sítio S2' na subunidade S2. Há duas rotas de entrada para o vírus, uma dependente da formação de uma partícula endocítica (Figura 4) e outra na qual a fusão de membranas ocorre independentemente da formação da partícula endocítica. Na rota de entrada do vírus dependente da formação de uma partícula endocítica, após a ligação do vírus ao ACE2 começa o processo de internalização por meio do processo de endocitose mediada por clatrina.

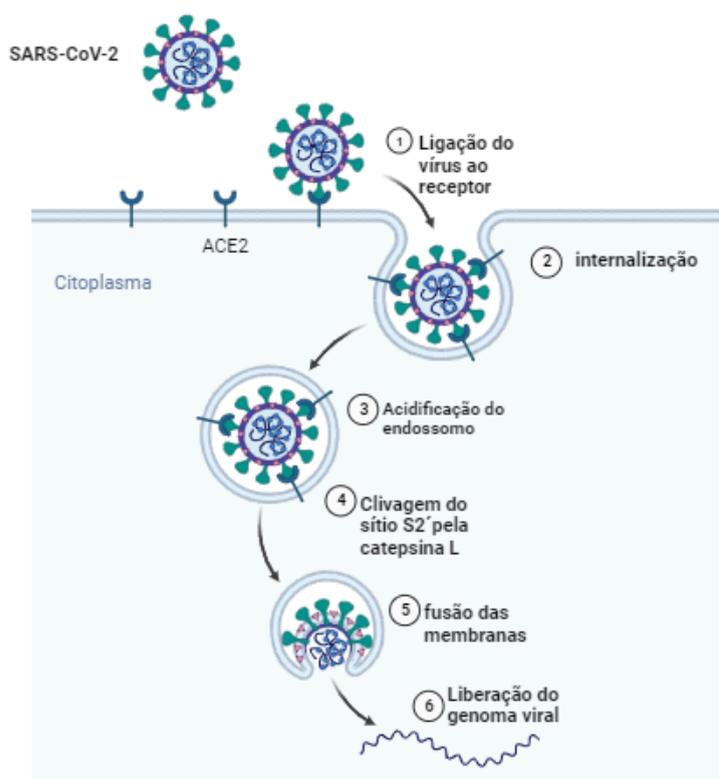


Figura 4. Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 por via Endossomal. A ligação do vírus ao ACE2 induz mudanças conformacionais na subunidade S2, levando a internalização do vírus em uma partícula endossômica. A acidificação do endossomo permite que a catepsina L clive o sítio S2' levando a exposição do Peptídeo de Fusão e mudanças conformacionais na HR1, projetando o Peptídeo de Fusão em direção a membrana. Assim, o material genético do vírus é liberado no citoplasma (HOFFMANN, *et al.*, 2020).

Dentro da partícula endocítica, a cathepsina L realiza a clivagem do sítio S2' quando há a presença de um ambiente ácido. A clivagem do sítio S2' leva a exposição do Peptídeo de Fusão, desencadeando uma série de mudanças conformacionais, especialmente na HR1 o que empurra o Peptídeo de Fusão contra a membrana da partícula endocítica, culminando na fusão das membranas. Nesse momento, o material genético do vírus fica disponível no citoplasma da célula hospedeira (HOFFMANN, *et al.*, 2020).

Na rota de entrada do vírus na célula hospedeira que independe da formação da partícula endocítica, é necessária a ação da TMPRSS2 na superfície da membrana celular (Figura 5). Assim como na rota de entrada dependente da formação da partícula endocítica, a clivagem do sítio S2' leva a exposição do Peptídeo de Fusão e mudanças conformacionais na subunidade S2 que projetam o Peptídeo de Fusão em direção da membrana da célula alvo, iniciando o processo de fusão. Esse processo de fusão forma um poro pelo qual o RNA viral é capaz de passar e iniciar seu processo de transcrição/replicação.

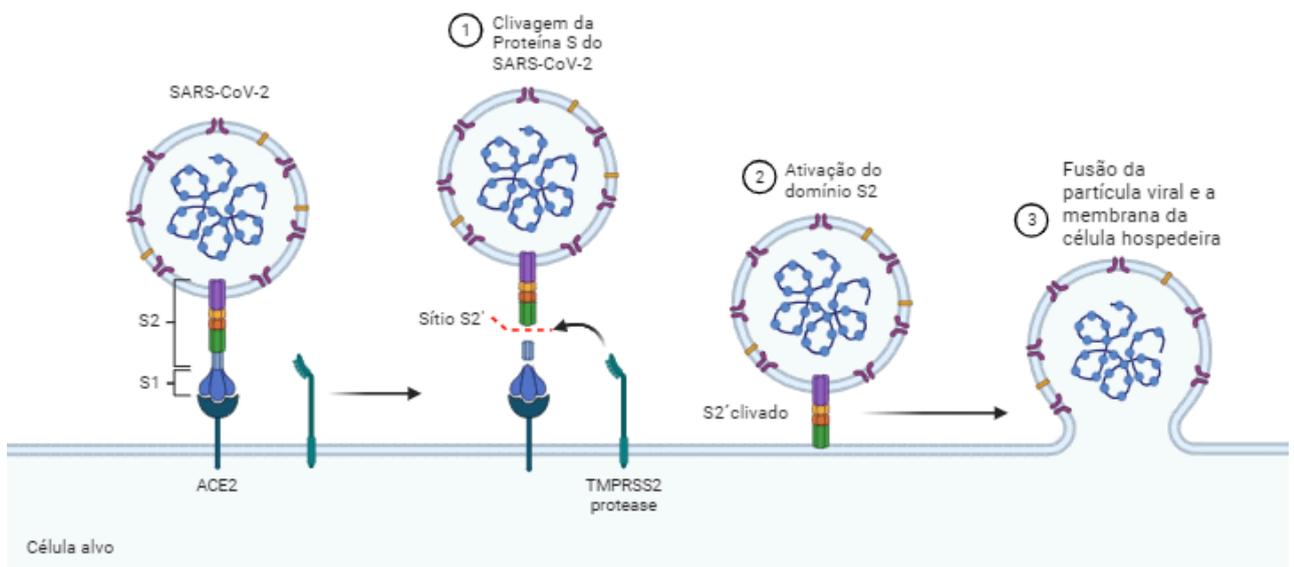


Figura 5. Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 pela membrana celular. A ligação do vírus ao ACE2 induz mudanças conformacionais na subunidade S2. O sítio de clivagem S2' pode ser clivado pela TMPRSS2 já na membrana plasmática. A clivagem do sítio S2' leva à exposição do Peptídeo de

Fusão e mudanças conformacionais na HR1, projetando o Peptídeo de Fusão em direção à membrana (HOFFMANN, *et al.*, 2020). Assim, o material genético do vírus é liberado no citoplasma. Assim, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais não só que bloqueiam a interação da Proteína S com ACE2 mas também aqueles que se liguem em epítomos críticos na Proteína S que interfiram com a clivagem do sítio S2' são propostas viáveis para o combate à infecção.

1.1.3 As variantes do SARS-CoV-2

As variantes do SARS-CoV-2 são resultado de mutações no genoma viral, e quando uma diferença fenotípica é observada entre as variantes, ela é denominada uma cepa. As variantes do SARS-CoV-2 foram classificadas em variantes de interesse (VOI) e variantes de preocupação (VOC). As VOIs inclui as variantes com marcadores característicos que estão associados a mudanças no RBD, queda na capacidade de ligação de anticorpos desenvolvidos contra infecção anterior ou pela vacinação, diminuição na eficácia de tratamentos, impacto sobre o diagnóstico e aumento na transmissibilidade e severidade da doença. As VOCs incluem as variantes com aumento na transmissibilidade, aumento da severidade da doença, queda na capacidade de neutralização de anticorpos, redução da eficácia de tratamentos e falhas na detecção para diagnóstico.

Uma das primeiras variantes do SARS-CoV-2 foi a D614G, que rapidamente se tornou dominante em todo o mundo. Em comparação com o vírus original de Wuhan, a variante D614G era mais eficiente em infectar células do trato respiratório superior, além de ter taxas de replicação superiores ao vírus ancestral. Ela não demonstrou a capacidade de reinfeção ou de infecção de pessoas vacinadas contra o vírus original de Wuhan. Um estudo com o soro de pacientes vacinados com BNT162b2 (fabricado pela Pfizer) e mRNA-1273 (fabricado pela Moderna) mostrou que há uma pequena queda no nível de neutralização do soro em ensaios de neutralização com pseudovírus (GARCIA-BELTRAN *et al.* 2021). O soro de pacientes convalescentes também se mostrou ser efetivo na neutralização da variante D614G (HOU, *et al.*, 2020), corroborando que não ocorre o escape mutacional para essa variante.

A variante Alfa (inicialmente B.1.1.7) foi identificada em setembro de 2020, no Reino Unido (Figura 6). A variante Alfa contém 23 mutações se comparada ao vírus original de Wuhan, sendo que 8 dessas mutações estão na Proteína S. Dentre elas estão presentes a mutação D614G e também N501Y, que é uma alteração dentro do Domínio de Ligação ao Receptor ACE2, o RBD.

(GALLOWAY, *et al.*, 2021; LIU, *et al.*, 2021). A mutação N501Y parece permitir que o RBD se ligue mais firmemente ao ACE2 (VASIREDDY, *et al.*, 2021).

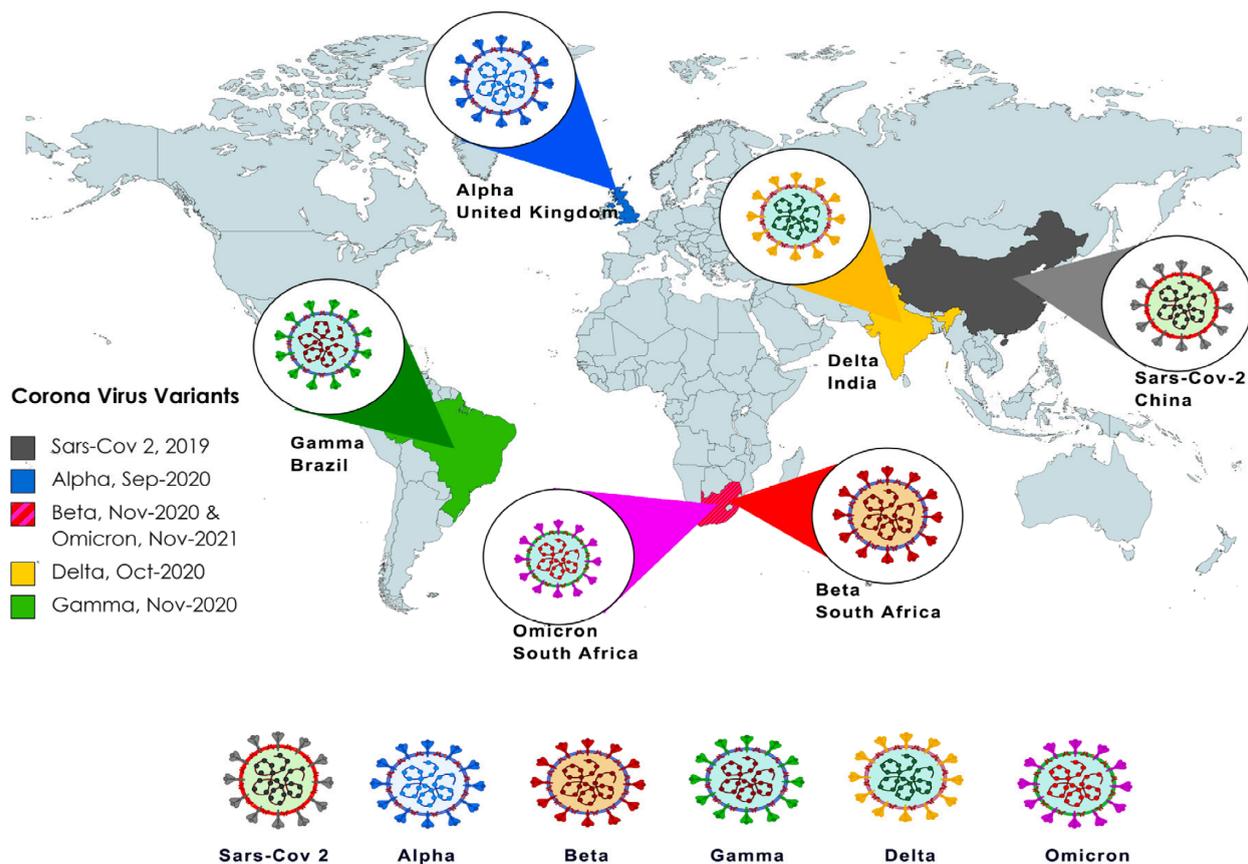


Figura 6. Mapa mundial ilustrando os anos e os países afetados pelos diferentes VOCs do SARS-CoV-2. Cada VOC é representada por cores. Alfa (B.1.1.7) originou-se no Reino Unido, seguido por Beta (B.1.351), que teve origem na África do Sul. Em abril de 2021, Delta (B.1.617.2) foi detectado na Índia. Omicron (B.1.1.529) é a VOC identificada mais recentemente e está dividida nas linhagens BA.1, BA.2, BA.4 e BA.5 e em várias sub-linhagens. Adaptado de ANDRE, *et al.*, 2023.

A Variante Beta, provém da linhagem B.1.351 e se diversificou em várias cepas diferentes, sendo primeiramente identificada na África do Sul ainda em 2020 (Figura 6). A linhagem B.1.351 possui três mutações no RBD, (E484K, N501Y e K417N) além de mutações fora do RBD. A mutação E484K é uma das principais mediadoras do escape de anticorpos. Tanto a variante Alfa como a Beta possuem uma taxa de transmissibilidade cerca de 50% maior que o vírus original de Wuhan.

Em Dezembro de 2020 foi isolada no Brasil a variante Gama (inicialmente denominada como P.1), provinda da linhagem B.1.1.28. A variante Gama possui 35 mutações com 17 trocas de aminoácidos, incluindo as mutações E484K, N501Y e K417N. Essa variante mostrou uma

queda na neutralização pelo soro de pessoas convalescentes ou vacinadas e foi relacionada a casos de reinfecção.

A variante Delta foi isolada na Índia no final do ano de 2020. Em comparação com a variante Alfa, a variante Delta possui 23 mutações, e 12 delas na Proteína S. Duas mutações com capacidade de afetar a capacidade de ligação de anticorpos foram identificadas nessa variante, nas posições L452R e T478K, ambas dentro do RBD, e também há a mutação P681R. A troca de uma arginina por uma leucina na posição 452 aparentemente leva a uma maior afinidade ao ACE2. A troca de uma arginina por uma prolina na posição 681 parece auxiliar na clivagem da precursora da Proteína S em suas subunidades S1 e S2, o que levaria a uma maior capacidade de fusão e integração do vírus com a célula hospedeira (GONG, *et al.*, 2022; SHIEHZADEGAN, *et al.*, 2021).

A última variante do SARS-CoV-2 a ser reportada foi a variante Omicron, ela foi identificada inicialmente na África do Sul, em novembro de 2021. A variante Omicron rapidamente se tornou dominante em todo o mundo. A variante Omicron excedeu todas as outras variantes em número de mutações, são 50 mutações de maneira que 32 são na Proteína S. Além disso, dessas 32 mutações, 15 são dentro dos resíduos de aminoácidos que compõem o RBD (Figura 7). Nove das 15 mutações dentro do RBD, são em resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o ACE2. Portanto a variante Omicron é mais transmissível do que qualquer uma das variantes anteriores e é capaz de escapar da imunidade estimulada pela vacinação ou pela infecção anterior (GONG, *et al.*, 2022).

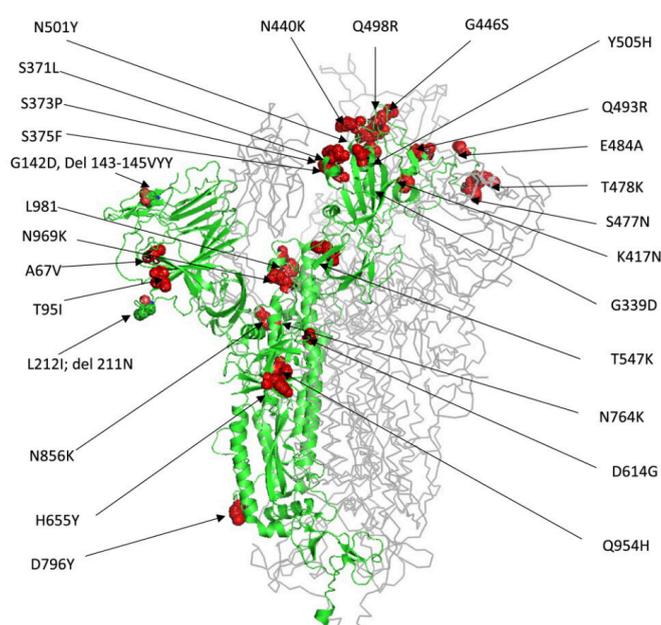


Figura 7. Representação das substituições de aminoácidos na proteína S da variante Omicron

(PDB ID 7TGW). Esferas vermelhas indicam os aminoácidos em que houve alteração em comparação com o vírus original de Wuhan. Adaptado de SHRESTHA, *et al.*, 2022.

A variante Omicron inicialmente foi classificada em três sublinhagens: B.A 1, B.A 2 e B.A 3, que foram descobertas simultaneamente. Em seguida, foram definidas as sublinhagens B.A 4 e B.A 5. e outras sublinhagens dentro da sublinhagem B.A 1 e B.A 2. Por fim surgiram as sublinhagens BA.5, BQ.1, BQ.1.1 e XBB.1.5. As sublinhagens B.A 1 e B.A 2 possuem muitas mutações em comum, embora cada uma possua mutações únicas. A sublinhagem B.A. 1.1, provinda da sublinhagem B.A 1, é muito semelhante a sua sublinhagem de origem. Ambas as versões da sublinhagem B.A 1 são menos transmissíveis. A mutação R346K no RDB da sublinhagem B.A. 1.1 aumentou a interação com o ACE2 (ANDRE, *et al.*, 2023; SHRESTHA, *et al.*, 2022).

A sublinhagem B.A 2 se tornou a versão da variante Omicron dominante em todo o mundo no início de 2022. Em comparação com a sublinhagem B.A. 1, a B.A 2 possui 7 substituições de aminoácidos e 3 deleções de aminoácidos. Dentro do RBD essa sublinhagem possui 4 mutações novas: S371F, T376A, D405N e R408S. As mutações D405N e R408S podem afetar a ligação de anticorpos, pois são resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com o ACE2 (KANNAN,*et al.*, 2022).

As sublinhagens B.A 4 e B.A 5 são similares a B.A 2 embora possuam mutações únicas, como as mutações L452R e F486V. Anticorpos produzidos em decorrência da vacinação são menos efetivos contra a B.A 4 e B.A 5 do que contra as versões anteriores da variante Omicron.

No final de 2022, surgiram as sublinhagens B.Q 1 e B.Q 1.1. Já no início de 2023 surgiu a variante XBB 1.5, uma sublinhagem da variante XBB. No RBD, a sublinhagem XBB 1.5 possui a mutação S486P que causa um aumento da infectividade por meio do aumento da afinidade do RBD pelo receptor ACE2 (PARUMS, *et al.*, 2023).

1.2 Anticorpos

Anticorpos são moléculas produzidas pelos linfócitos B em resposta a antígenos (revisado por TALREJA, *et al.*, 2020). A origem do termo anticorpo vem do trabalho do pesquisador Paul Ehrlich. No ano de 1891 Paul buscava entender como nosso sistema imunológico era capaz de reconhecer diferentes patógenos. Através da observação de técnicas de coloração de tecidos, Paul percebeu que certas substâncias tinham uma afinidade por partes específicas do corpo. Como o azul de metileno que tinha uma afinidade pelo sistema nervoso. Ele imaginou que poderia existir “Balas Mágicas” que permitiria ao corpo reconhecer ameaças como vírus e bactérias. Então quando surgisse uma ameaça, células

especiais do corpo chamadas de Antikörper (do alemão, anticorpo) se ligariam aos antígenos levando a sua destruição. Ele acreditava que as células do sistema imune interagiam com os antígenos através do que ele chamava de cadeias laterais.

Embora a teoria de Paul tivesse alguns problemas, ele deu alguns dos primeiros passos para a descoberta dos anticorpos. A característica mais importante dos anticorpos é sua alta especificidade, cada anticorpo reconhece um antígeno e é capaz de se ligar a ele com uma alta especificidade. Os anticorpos são os mediadores da resposta imune humoral, e diferentemente dos receptores de antígenos presentes nos linfócitos T, eles são capazes de reconhecer diretamente os antígenos.

Os anticorpos podem se apresentar em duas formas, ancorados à membrana celular de linfócitos B, ou então na forma de anticorpos secretados, presentes na circulação. O reconhecimento de um antígeno por uma imunoglobulina na superfície de um linfócito B virgem ativa essa célula. Após essa ativação, o linfócito B pode se diferenciar em um plasmócito, uma célula especializada na secreção de moléculas de anticorpo.

A estrutura geral de um anticorpo é composta pela associação de duas cadeias, denominadas como leve e pesada (Figura 8). Dentro dessas cadeias há as regiões variáveis e as regiões constantes. As regiões variáveis da cadeia pesada (VH) e leve (VL) associadas formam o paratopo do anticorpo, que é a parte do anticorpo que interage diretamente com o antígeno. As regiões constantes da cadeia pesada são responsáveis por mediar as funções efetoras da molécula de anticorpo.

A cadeia pesada de uma imunoglobulina é formada pelo domínio variável da cadeia pesada (VH) e por três a quatro domínios constantes (CH). Já a cadeia leve é formada pelo domínio variável da cadeia leve (VL) e um domínio constante (CL). Cada anticorpo é composto por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves associadas por pontes dissulfeto. Assim, cada molécula de anticorpo apresenta dois sítios de ligação ao antígeno (paratopos).

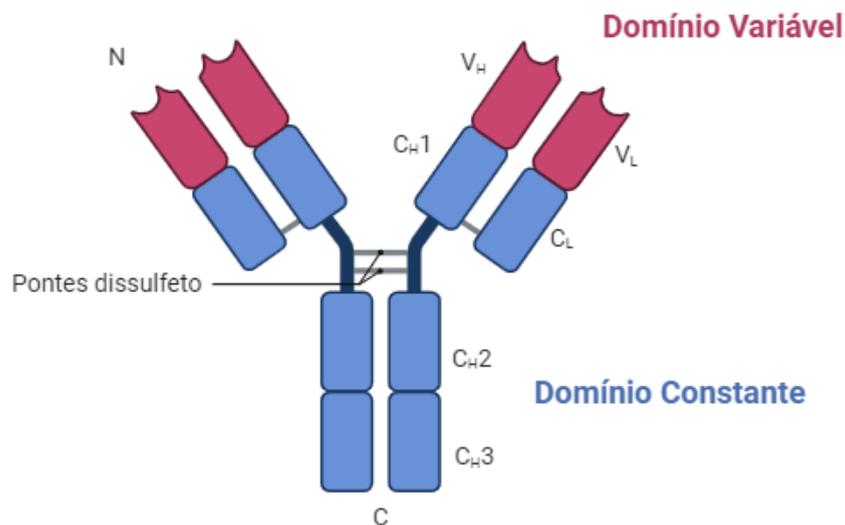


Figura 8. Estrutura de uma molécula de anticorpo. Representação de uma molécula de anticorpo do isotipo IgG. Em azul é representado o domínio constante que é praticamente igual em toda IgG, e em vermelho o domínio variável que é formado pelo VH e VL juntos. (Figura criada no Biorender)

As regiões constantes da cadeia pesada CH2 e CH3 formam o Fragmento cristalizável, conhecido como Fc. Essa porção do anticorpo pode ser obtida pela digestão desse com a enzima papaína, que libera o Fc e dois fragmentos conhecidos com FAB, o fragmento de ligação ao antígeno.

Dentro do VH e VL existem as regiões hipervariáveis conhecidas como CDR1, CDR2 e CDR3. Cada região hipervariável é formada por aproximadamente 10 resíduos de aminoácidos, e essas regiões são intercaladas com outros aminoácidos estruturais que formam o arcabouço do anticorpo. As três regiões hipervariáveis do VH associadas às três regiões hipervariáveis do VL formam o paratopo do anticorpo. A CDR3 é a mais variável e também a que medeia a maior parte do contato com o antígeno. O mecanismo genético pelo qual é gerado essas regiões hipervariáveis é conhecido como recombinação V(D)J. A variabilidade das CDRs pode aumentar ainda mais pelo processo de hipermutação somática.

Os genes que codificam as regiões variáveis de cada anticorpo são gerados pelo rearranjo dos segmentos gênicos das regiões variáveis (V), de diversidade (D) e de junção (J). A recombinação V(D)J reuni os genes dos receptores de imunoglobulinas, assim como ocorre nos receptores dos linfócitos T (SCHATZ, *et al.*, 2011). Para formação do domínio variável da cadeia pesada, um dos diversos segmentos gênicos da região V e combinado com um segmento da região D e com um segmento J, esses genes são colocados um atrás do outro em

um mesmo locus cromossômico. Enquanto isso, para a formação do domínio variável da cadeia leve, apenas os segmentos V e J são combinados. Existem três *loci* separados que codificam as cadeias pesadas e as cadeias leves κ e λ , de forma que esses genes estão localizados em cromossomos diferentes. Em humanos, o locus da cadeia pesada está localizado no cromossomo 14. O locus da cadeia leve κ está no cromossomo 2 e o da cadeia leve λ está no cromossomo 22.

Para que o processo de recombinação ocorra nos linfócitos, pequenos segmentos gênicos denominados como sequências sinais de recombinação (RSS) precisam ser reconhecidos. As RSS consistem em um segmento de 7 nucleotídeos, conhecidos como heptâmeros, que estão localizados na extremidade 3' do segmento gênico V, na extremidade 5' do segmento J e de ambos os lados do segmento D. Após a RSS há a sequência de um espaçador com 12 ou 23 nucleotídeos e a sequência de 9 nucleotídeos conhecida como nonâmero. Essa sequência de espaçadores permite que os heptâmeros estejam na posição correta para a clivagem pelas enzimas Rag-1 e Rag-2 (Figura 9).

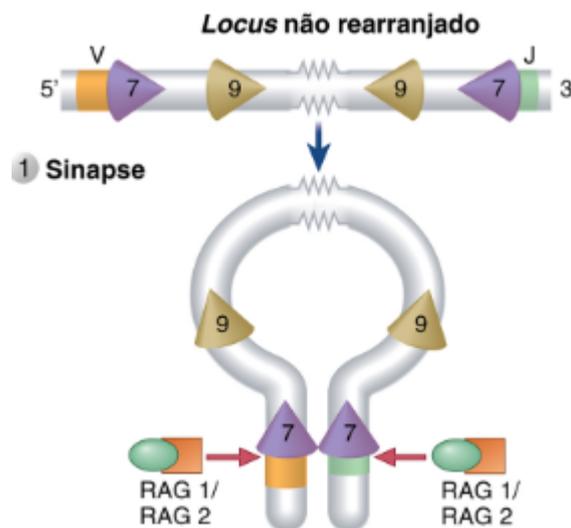


Figura 9. Etapa da Sinapse na recombinação V(D)J. O DNA no cromossomo forma uma alça nas regiões próximas ao heptâmetro, de maneira que os segmentos gênicos codificadores das regiões V, D ou J são aproximados. Adaptado de ABBAS, 2019.

Na primeira etapa da recombinação conhecida como sinapse, as RSS de dois segmentos gênicos são aproximados por uma alça formada no cromossomo. Com os heptâmeros posicionados, a quebra da dupla fita é catalisada pelas enzimas Rag-1 e Rag-2. Além do processo de quebra da fita de DNA, o complexo formado pela Rag-1 e Rag-2 mantém as extremidades 3' e 5' geradas unidas para que outras enzimas como a Artemis e a desoxinucleotidil-terminal-transferase (TdT) possam agir, processando as extremidades

adicionando ou retirando nucleotídeos. Por fim, as extremidades codificadoras são ligadas pelos mecanismos de reparo ao DNA de dupla fita (Figura 10).

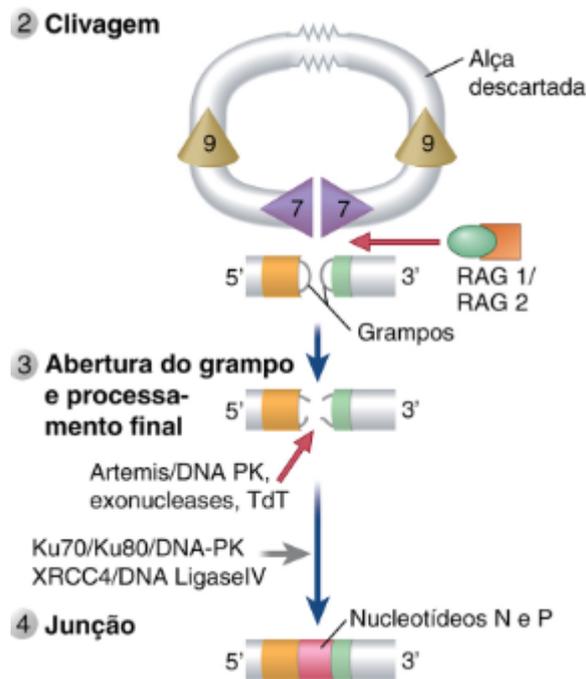


Figura 10. Demais etapas da recombinação V(D)J. O DNA é clivado nas regiões próximas ao heptâmetro pelo complexo formado pelas enzimas Rag-1 e Rag-2. A região do grampo é processada pela Artemis e TdT e as extremidades são unidas pelo mecanismo de reparo da junção terminal não homóloga. Adaptado de ABBAS, 2019.

Por meio do processo de recombinação V(D)J cada linfócito B é capaz de gerar anticorpos específicos para um único antígeno. Por meio desse processo o sistema imune é capaz de produzir 10^{11} formas de anticorpos diferentes, demonstrando a ampla capacidade do sistema imune a responder a diferentes agentes patológicos.

1.3 Anticorpos Monoclonais

A possibilidade de se produzir anticorpos monoclonais provém do estudo de tumores de linfócitos B. Os plasmócitos são clones de células B especializados na produção de anticorpos, e cada célula B é capaz de produzir apenas um tipo de anticorpo, com uma especificidade. Para o desenvolvimento da técnica de produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de interesse era preciso imortalizar uma célula produtora do anticorpo de interesse. Isso foi conseguido por meio da fusão de linfócitos B isolados do baço com uma linhagem imortal de células de mieloma. Essas células originadas da fusão foram chamadas de hibridomas. A tecnologia de hibridomas foi desenvolvida por Georges Kohler e Cesar

Milstein, que lhes valeu o prêmio Nobel em 1975 (CHUNG, *et al.*, 2023; TALREJA, *et al.*, 2020).

Por meio da tecnologia do hibridoma foi gerado o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o uso terapêutico, o OKT3. Esse anticorpo foi desenvolvido com objetivo de reduzir a possibilidade de rejeição em transplantes. A produção de anticorpos por meio de hibridomas demandam um alto investimento financeiro. Além disso os anticorpos gerados eram murinos e por isso eram altamente imunogênicos levando a resposta imune do hospedeiro contra o anticorpo murino. Essa foi uma das razões do OKT3 ter sido retirado do mercado.

Para contornar a imunogenicidade dos anticorpos murinos, surgiram algumas técnicas como a quimerização da molécula de anticorpo (Figura 11). Anticorpos quiméricos possuem as regiões constantes da cadeia leve e pesada murinas substituídas por regiões constantes humanas, e apenas o domínio VH e VL permanecem murinos (BILLETТА, *et al.*, 1993). Assim foi possível reduzir a imunogenicidade de anticorpos murinos. O abciximab foi o primeiro anticorpo quimérico aprovado para o uso em humanos pelo FDA. O abciximab era indicado para evitar a agregação plaquetária em doenças cardíacas. Entretanto, anticorpos quiméricos apesar de menos imunogênicos ainda apresentam imunogenicidade, que ainda pode levar a resposta imune do hospedeiro.

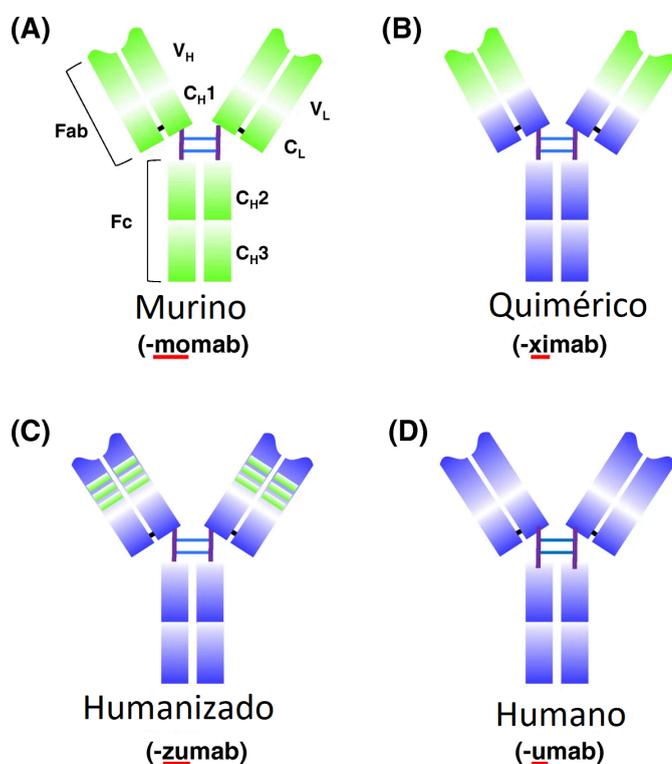


Figura 11. Desenvolvimento de anticorpos, de murino a completamente humano. (A) O anticorpo completamente murino. (B) O anticorpo quimérico, as regiões variáveis (verde) são murinas e o resto do anticorpo (azul) é humano. (C) O anticorpo humanizado, somente as CDRs (verde) são murinas e o resto do anticorpo (azul) é humano. (D) Anticorpo humano, toda a molécula é humana. Adaptado de LU, *et al.*, 2020.

Os anticorpos quiméricos apesar de menos imunogênicos ainda apresentam uma imunogenicidade considerável. Outra técnica que surgiu para reduzir ainda mais a imunogenicidade de moléculas murinas foi a humanização de anticorpos. Essa técnica consistia em transplantar as CDRs 1, 2 e 3 murinas dos anticorpos para um arcabouço de anticorpo humano, ou seja apenas as CDRs permaneciam murinas e as demais partes do anticorpo eram totalmente humanas (Figura 11). O primeiro anticorpo humanizado aprovado pelo FDA foi o daclizumab, um anticorpo contra o receptor de IL-2 que era utilizado na prevenção da rejeição de transplantes (LU, *et al.*, 2020).

A geração de anticorpos completamente humanas foi a chave para resolver definitivamente a questão da imunogenicidade de anticorpos murinos. Duas técnicas inicialmente possibilitaram o desenvolvimento de anticorpos completamente humanos, o Phage Display e as linhagens de camundongo transgênicos XenoMouse e HuMabMouse. A técnica de Phage Display foi desenvolvida por Gregory P. Winter e George P. Smith, que demonstraram que genes exógenos poderiam ser expressos na superfície do capsídeo viral de bacteriófagos. Smith desenvolveu uma metodologia poderosa para a rápida seleção de anticorpos contra qualquer antígeno. Para isso, uma biblioteca de fagos contendo genes de imunoglobulinas humanas era gerada, então os fagos eram apresentados ao antígeno de interesse em ciclos de seleção até que anticorpos altamente específicos fossem selecionados.

As linhagens de camundongo transgênicos XenoMouse e HuMabMouse também permitiram a geração de anticorpos completamente humanos. Essas linhagens de camundongo foram geradas por meio da adição dos genes de imunoglobulinas humanas no genoma do animal, substituindo os genes de imunoglobulinas endógenos. Esses animais, sintetizam assim anticorpos humanos.

1.4 Anticorpos Terapêuticos

Desde da aprovação do OKT3 diversos outros anticorpos foram aprovados para o uso em humanos. Atualmente, 79 anticorpos monoclonais terapêuticos foram aprovados pelo FDA e anticorpos monoclonais se tornaram a principal forma de tratamento para diversas doenças. Com o desenvolvimento da tecnologia de seleção e expressão de anticorpos, cada

vez mais anticorpos são aprovados ao longo dos anos (Figura 12).

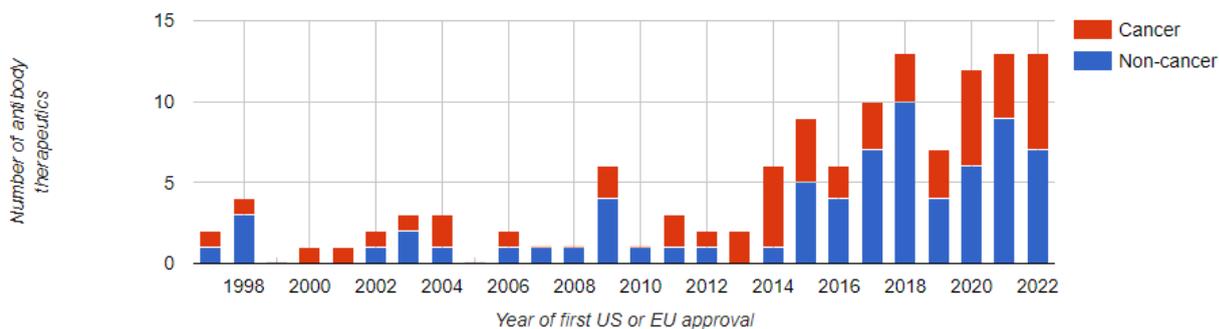


Figura 12. Número de anticorpos terapêuticos aprovados nos Estados Unidos e Europa. Número de anticorpos aprovados entre 1997 e 2022, em vermelho anticorpos para o tratamento de cânceres, em azul demais anticorpos para tratamento de outras doenças. Adaptado de The Antibody Society. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US. (Acesso em:04/12/2023); www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies.

Anticorpos Monoclonais têm sido usados para diversos tratamentos, desde supressão do sistema imunológico para transplantes ou doenças autoimunes, no combate ao Câncer, e até mesmo para tratamento de doenças infecciosas (Tabela 1). Em 2018 foi aprovado os primeiros anticorpos para o tratamento de doenças virais e muitos outros foram autorizados para uso emergencial durante a pandemia do SARS-CoV-2.

Tabela 1. Anticorpos Terapêuticos contra doenças infecciosas. Anticorpos monoclonais contra doenças infecciosas aprovados pelo FDA e EMA. Adaptado de: The Antibody Society. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in regulatory review. (acesso em 04/12/2023); www.antibodysociety.org/antibody-therapeutics-product-data

Nome	nome comercial	Alvo	Origem da sequência	Backbone	Primeiro ano de aprovação na EU	Primeiro ano de aprovação nos EUA	Primeira aprovação global (país, ano) ou país em revisão
Amubarvimab + Romlusevimab		SARS-CoV-2	Humano	IgG1	NA	NA	China, 2021#
Ansvimab-zykl	Ebanga	glicoproteína do vírus Ebola	Humano	IgG1	NA	2020	EUA, 2020
Atoltivimab, maftivimab, and odesivimab-ebgn	Inmaze	vírus Ebola	Humano	IgG1	NA	2020	EUA, 2020

Bezlotoxumab	Zinplava	Enterotoxina B de <i>Clostridium difficile</i>	Humano	IgG1	2017	2016	EUA, 2016
Casirivimab + Imdevimab	REGEN-COV, Ronapreve	SARS-CoV-2	Humano	IgG1	2021	EUA#	Japão, 2021
Docaravimab e Miromavimab	Twinrab	Rabies virus	Murino	mIgG2b and mIgG1	NA	NA	India, 2019
Ibalizumab (ibalizumab-uiyk)	Trogarzo	CD4	Humanizado	IgG4	2019	2018	EUA, 2018
Nebacumab	Centoxin	Endotoxina	Humano	IgM	1991*#	NA	Holanda, Inglaterra, França, Alemanha, 1991
Nirsevimab	Beyfortus	RSV	Humano	IgG1	2022	2023	EU, 2022
No INN; RabiShield	RabiShield	Glicoproteína do Rabies virus	Humano	IgG1	NA	NA	Índia, 2016
Obiltoximab	Anthim	B. anthraxis PA	Quimérico	IgG1	2020	2016	EUA, 2016
Ormutivimab	Pendente	glicoproteína do Rabies virus	Humano	IgG1	NA	NA	China, 2022
Palivizumab	Synagis	RSV	Humanizado	IgG1	1999	1998	EUA, 1998
Raxibacumab	(Pending)	B. anthraxis PA	Humano	IgG1	NA	2012	EUA, 2012
Regdanvimab	Regkirona	SARS-CoV-2	Humano	IgG1	2021	NA	Coreia do Sul, 2021
Sotrovimab	Xevudy	SARS-CoV-2	Humano	IgG1	2021	NA	Austrália, 2021
Tixagevimab, cilgavimab	Evusheld	SARS-CoV-2	Humano	IgG1	2022	EUA#	EU, 2022

Na Tabela 1 são apresentados diversos anticorpos aprovados para o tratamento de doenças infecciosas, inclusive alguns anticorpos que passaram por revisão regulatória. Há também alguns que foram posteriormente retirados do mercado (destacados em vermelho). A maioria dos anticorpos aprovados, são expressos em células de mamíferos, principalmente na linhagem celular CHO (Chinese Hamster ovary). Células de mamíferos apresentam a vantagem de possuírem a capacidade de realizar todas as modificações pós-traducionais necessárias para o funcionamento de uma molécula de anticorpo, inclusive as glicosilações na porção Fc que são necessárias para a função efetora dos anticorpos. (KHANDIA, *et al.*, 2018).

Atualmente podemos gerar fragmentos de anticorpos com formatos variados (Figura 13). Os formatos de fragmentos de anticorpos mais conhecidos são o Fab e os scFvs. Esses

fragmentos apresentam as vantagens de serem moléculas menores que um anticorpo inteiro e reterem a capacidade de se ligar aos antígenos. Esses fragmentos possuem a vantagem de poderem ser expressos em células de microrganismos, pois não possuem a porção Fc e consequentemente são de enovelamento menos complexo e também não necessitam de alterações pós-traducionais.

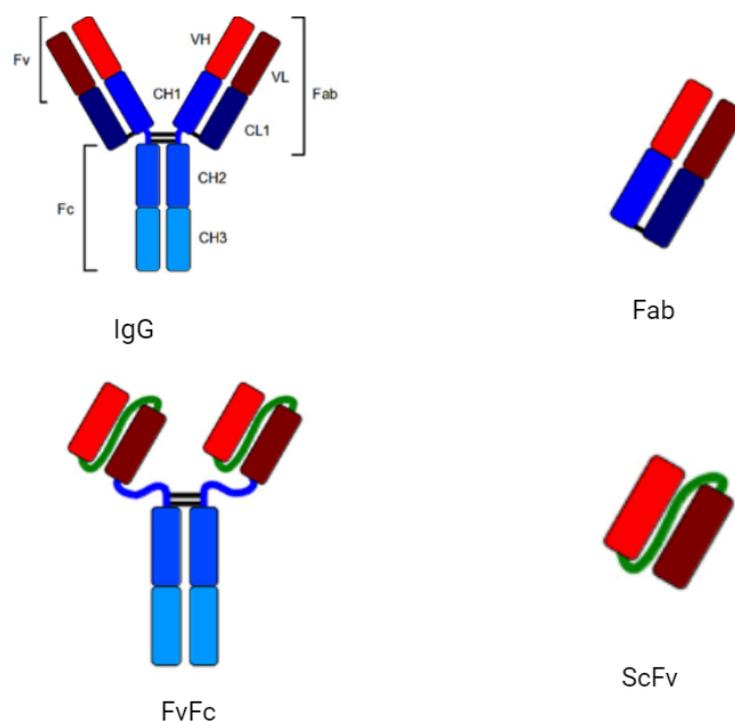


Figura 13. Diferentes formatos de Fragmentos de anticorpos comparados a IgG. Em Vermelho e vermelho escuro: Domínios variáveis da cadeia pesada e leve, respectivamente; azul: regiões constantes; verde: *linkers* peptídicos artificiais. Adaptado de FENZEL, *et al.*, 2013.

O fragmento Fab é composto pelo VH e VL associados à cadeia CH1 e ao CL. Esse formato de anticorpo é comumente utilizado na construção de bibliotecas de Phage Display. Já o fragmento scFv é constituído pela associação do VH ao VL, conectados por um peptídeo conector. O fragmento FvFc possui o VH e VL associado diretamente aos domínios constantes CH2 e CH3, portanto essa molécula não possui os domínios constantes CH1 e CL. Os fragmentos scFv e Fab podem ser utilizados para várias aplicações onde apenas a ligação ao antígeno seja necessária, até mesmo para a neutralização de infecções virais (FENZEL, *et al.*, 2013).

Para a expressão de fragmentos de anticorpos no formato scFv, organismos procaríotos são preferíveis. A *Escherichia coli* é o microrganismo preferencial para a expressão de proteínas heterólogas, permitindo grandes rendimentos em grama por litro.

Inicialmente, a produção de fragmentos de anticorpos em bactérias era realizada com uma etapa de translocação para a região do periplasma, onde há um ambiente mais oxidativo em comparação com o citoplasma bacteriano. A expressão de anticorpos no citoplasma bacteriano costumava levar a formação de agregados não funcionais. Essa etapa de translocação demandava um alto gasto energético, o que limitava a produção de proteínas com o correto dobramento. Entretanto, muitas linhagens de *E. coli* modificadas para apresentarem um citoplasma oxidante foram geradas, o que permitiu a expressão de anticorpos no citoplasma (LEVY, *et al.*, 2001; ROBINSON, *et al.*, 2015).

1.5 Anticorpos Monoclonais contra o SARS-CoV-2

Durante o início da pandemia do SARS-CoV-2, a rápida disseminação do vírus fez com que a busca por novos tratamentos se tornasse uma prioridade para a comunidade científica (JAHANSHAHLU, *et al.*, 2020). O tratamento de doenças infecciosas por meio de anticorpos monoclonais já havia sido proposto para outras doenças virais como o Ebola e o HIV (BLAIR, 2020; MARKHAM, 2021). Enquanto as vacinas são a primeira opção para prevenção de infecção, os anticorpos monoclonais podem ser utilizados para o tratamento de pessoas já infectadas (NATHAN, *et al.*, 2021).

Durante a pandemia do SARS-CoV-2 vários anticorpos monoclonais receberam autorização para uso emergencial. A maior parte destes anticorpos eram expressos no formato de IgG e tinham como alvo a Proteína S, especialmente a subunidade S1 e o RBD. Vários estudos clínicos foram conduzidos para avaliar a capacidade terapêutica e de profilaxia de vários anticorpos monoclonais. Na tabela 2 estão representados alguns anticorpos que foram autorizados pelo FDA ou pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA).

Tabela 2. Lista de anticorpos monoclonais aprovados para tratamento ou profilaxia da COVID-19. Anticorpos monoclonais contra o SARS-CoV-2 aprovados pelo FDA e EMA. Adaptado de FOCOSI, *et al.*, 2022.

Anticorpo	Autorização pelo FDA	Autorização pelo EMA
Bamlanivimab	9 de novembro de 2020, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com alto risco de progressão da doença; revogado em 15 de abril de 2021	Não autorizado
Bamlanivimab e etesevimab	9 de fevereiro de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com alto risco de	Autorização concedida em 11 de março de 2021, para terapia precoce em pacientes

	progressão da doença; restrito em 24 de janeiro de 2022	ambulatoriais com risco de progressão da doença; retirado pela Eli Lilly em 29 de outubro de 2021
Casirivimab e imdevimab	21 de novembro de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com alto risco de progressão da doença; restrito em 24 de janeiro de 2022	Autorização concedida em 12 de novembro de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com risco de progressão da doença e profilaxia pós-exposição
Tixagevimab e cilgavimab	8 de dezembro de 2021, para profilaxia pré-exposição	Em revisão
Sotrovimab	26 de maio de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com alto risco de progressão da doença; retirado em 5 de abril de 2022	Autorização em 17 de dezembro de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com risco de progressão da doença
Regdanvimab	Não aprovado	Autorização concedida em 12 de novembro de 2021, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com risco de progressão da doença
Bebtelovimab	11 de fevereiro de 2022, para terapia precoce em pacientes ambulatoriais com alto risco de progressão da doença	Não autorizado

Os anticorpos bamlanivimab e etesevimab foram desenvolvidos pela companhia farmacêutica Eli Lilly. O bamlanivimab foi o primeiro anticorpo aprovado para o tratamento de COVID-19, e posteriormente ele foi combinado com o etesevimab. Ambos os anticorpos se ligam na Região do RBD em epítomos distintos (NATHAN, *et al.*, 2021). Esses anticorpos foram isolados do soro de pessoas convalescentes por meio do *sorting* de células B de memória específicas para o RBD (SHI, *et al.*, 2020).

Nos estudos clínicos conduzidos o tratamento com o bamlanivimab e etesevimab se mostrou benéfico para pacientes com alto risco de progredir para COVID-19 severa ou internação. Concluiu-se também que o tratamento com esses anticorpos era mais efetivo se realizado o mais cedo possível após a confirmação da infecção, já que nas fases posteriores da doença a gravidade é causada principalmente pela resposta imunológica e não mais pela replicação viral (NATHAN, *et al.*, 2021).

O uso do bamlanivimab individualmente foi suspenso em Abril de 2021, devido ao

surgimento de variantes com mutações na região do RBD que prejudicavam a eficácia do medicamento. A partir de então, o bamlanivimab só poderia ser administrado juntamente com o etesevimab. Ambos os anticorpos mostraram uma queda na ligação as variantes Beta e Gama mas ainda eram capazes de neutralizar a variante Alfa (PLANAS, *et al.*, 2021;NATHAN, *et al.*, 2021).

Os anticorpos casirivimab e imdevimab compõem o coquetel de anticorpos REGN-COV-2, também chamado de coquetel de Regeneron. Os dois anticorpos possuem epítomos não sobreponíveis no RBD, o que permite que ambos se liguem simultaneamente ao antígeno. Esses anticorpos foram isolados a partir de camundongos humanizados com genes de imunoglobulinas humanas e do soro de pacientes convalescentes. (HANSEN, *et al.*, 2020).

Em Novembro de 2021 o coquetel de Regeneron recebeu autorização para o uso emergencial para o tratamento de COVID-19 leve e moderado em pacientes adultos ou crianças (mais de 12 anos de idade e 40 quilos) que apresentavam risco de agravamento para casos de COVID-19 severa. Em estudos de fase 1 e 3 com pessoas não hospitalizadas, o coquetel de Regeneron foi capaz de reduzir a carga viral (NING, *et al.*, 2021). O coquetel de Regeneron teve seu uso restringido em janeiro de 2022 pelo FDA devido a sua ineficácia diante da variante Omicron que rapidamente se tornou dominante em todo o mundo (MAWAZI, *et al.*, 2021).

Os anticorpos tixagevimab e cilgavimab são dois anticorpos neutralizantes desenvolvidos pela AstraZeneca com epítomos não sobreponíveis, que são capazes de se ligar simultaneamente à Proteína S. Os dois anticorpos administrados juntos receberam o nome de AZD7442. Esses anticorpos foram isolados de células B de 2 indivíduos convalescentes que foram infectados com o SARS-CoV-2 de Wuhan.(ZOST, *et al.*, 2020).

O coquetel de anticorpos AZD7442 (tixagevimab e cilgavimab) recebeu autorização para uso profilático pós-exposição (NING, *et al.*, 2021). O coquetel AZD7442 mostrou capacidade de reduzir a taxa de infecção e desenvolvimento de COVID-19 severa em pacientes imunocomprometidos em tratamento profilático diante da variante Omicron nas sublinhagens BA.1 e BA.2 (NGUYEN, *et al.*, 2022). Em estudo de fase 3, realizado com adultos com alto risco de uma resposta inadequada a vacinação e alto risco de exposição ao SARS-CoV-2, mostrou a eficácia do coquetel AZD7442 na prevenção da COVID-19 (LEVIN, *et al.*, 2022).

O Sotrovimab é um anticorpo monoclonal desenvolvido em parceria pela Vir Biotechnology e GlaxoSmithKline. O Sotrovimab recebeu autorização para uso emergencial pelo FDA em Maio de 2021, e em Dezembro seu uso foi autorizado na Europa para o

tratamento de pessoas que não necessitavam de suplementação de oxigênio e que estavam em risco de progredir para COVID-19 severa (HEO, *et al.*, 2022).

O sotrovimab se liga em um epítipo dentro do RBD que inclui o resíduo de aminoácido N343 no qual há um glicano. Esse glicano aparentemente possui um papel crítico no mecanismo de abertura da Proteína S, atuando nas conformações do RBD. Esse resíduo de aminoácidos é extremamente conservado no RBD de Sarbecoronavírus, e não interfere na ligação ao ACE2 (CATHCART, *et al.*, 2021 ; SZTAIN, *et al.*, 2021)

Em experimentos *in vitro*, o sotrovimab mostrou capacidade de neutralizar diversas variantes do SARS-CoV-2, como Alfa, Beta, Gama e até mesmo a variante Omicron B.A 2 e B.A1 (CATHCART, *et al.*, 2021). Em estudos de fase 3, Sotrovimab reduziu o risco de progressão da COVID-19 para casos de COVID-19 severa em pessoas não hospitalizadas com alto risco de progredir para casos severos (HEO, *et al.*, 2022). O sotrovimab foi retirado ainda em 2022 devido a redução da efetividade diante da variante Omicron B.A1 (AGGARWAL, *et al.*, 2023).

O regdanvimab foi desenvolvido pela empresa Celltrion. O mecanismo de ação desse anticorpo está relacionado a ligação ao RBD e a inibição da interação com o receptor ACE2. O regdanvimab foi isolado por meio de Phage Display utilizando uma biblioteca construída a partir do genes de imunoglobulina do PBMC de pessoas convalescentes da Coreia do Sul. O RBD foi o antígeno utilizado na seleção (KIM, *et al.*, 2021; SYED, *et al.*, 2021).

Inicialmente o regdanvimab foi autorizado para uso na Coreia do sul para o tratamento de COVID-19 em pessoas acima de 50 anos que possuíam condições que poderiam levar ao desenvolvimento de COVID-19 severa. Ele também foi aprovado para o uso em adultos com COVID-19 com sintomas leves. O EMA aprovou o uso deste anticorpo em pessoas adultas que não necessitavam de suplementação de oxigênio e que tivessem alto risco de desenvolvimento de COVID-19 severa.

Em ensaios *in vitro*, regdanvimab foi capaz de neutralizar as variantes Gama e Delta com uma queda de afinidade ao RBD dessas variantes. Em estudos clínicos de Fase 2 e 3, o regdanvimab foi capaz de reduzir o risco de hospitalização ou morte em 72 % em pessoas com COVID-19 leve ou moderada (SYED, *et al.*, 2021).

O bebtelovimab é um anticorpo desenvolvido pela farmaceutica Eli Lilly assim como o bamlanivimab e etesevimab. Ele tem como antígeno o RBD. O bebtelovimab interage com o RBD por resíduos de aminoácidos que raramente sofreram alterações nas variantes do SARS-CoV-2 e portanto, poderia continuar efetivo mesmo diante da variante Omicron e suas sublinhagens (WESTENDORF, *et al.*, 2022).

O FDA aprovou o bebtelovimab para uso emergencial em fevereiro de 2022. O bebtelovimab foi indicado para o tratamento de pessoas com COVID-19 leve e moderada que tivessem risco de progressão para COVID-19 severa. Em estudos *in vitro*, o bebtelovimab foi capaz de neutralizar até mesmo as subvariantes B.A 4 e B.A5. Em estudos de Fase 2, o bebtelovimab mostrou atividade contra a variante Omicron (DOUGAN, *et al.*, 2022; HENTZIEN, *et al.*, 2022).

1.6 O Phage Display

A tecnologia do Phage Display permite a expressão de polipeptídeos exógenos na superfície de bacteriófagos. George P. Smith demonstrou que a inserção de polipeptídeos exógenos na superfície de bacteriófagos não afetava a capacidade de infecção deste. Já em 1990, o primeiro fragmento de anticorpo foi apresentado na superfície de um bacteriófago (Revisado por LEDSGAARD, *et al.*, 2022).

Gregory P. Winter desenvolveu uma metodologia para selecionar fragmentos de anticorpos contra um determinado antígeno. Em 2018 George P. Smith e Gregory P. Winter foram agraciados com o prêmio Nobel “pela exibição em fagos de peptídeos e anticorpos” (BARDERAS, *et al.*, 2019).

Atualmente, bibliotecas de Phage Display podem ser construídas utilizando os bacteriófagos filamentosos M13, fd e fl com diferentes fragmentos de anticorpos em sua superfície. Utilizando o bacteriófago M13, o fragmento de anticorpo é expresso fusionado à proteína III do capsídeo viral. Um fagomídeo, um plasmídeo com origem de replicação bacteriana e de fago, pode ser utilizado para inserção dos genes do fragmento de anticorpo no bacteriófago (READER, *et al.*, 2019). Como a inserção de um fragmento de anticorpo no capsídeo viral fusionado à proteína III não compromete a capacidade de infecção do vírus, quando há a montagem de uma nova partícula viral o fragmento de anticorpo é apresentado no capsídeo do vírus.

As bibliotecas de Phage Display podem ser naturais ou sintéticas. As bibliotecas naturais são geradas por meio do repertório imune de um doador previamente imunizado ou não contra um determinado antígeno. Quando não há a imunização prévia do doador, a biblioteca é considerada *naïve*. As bibliotecas imunes geradas a partir do repertório de um doador previamente imunizado contra o antígeno, costumam apresentar anticorpos com afinidade maior que anticorpos provindos de bibliotecas *naïves* (LEDSGAARD, *et al.*, 2022).

Para a construção de uma biblioteca de Phage Display os genes de imunoglobulina são isolados de linfócitos B de um ou vários doadores. Para isso, os linfócitos B são isolados do

PBMC e o RNA é extraído e utilizado como molde para a geração do cDNA por PCR. Esses fragmentos gênicos de imunoglobulinas, codificando milhares possíveis anticorpos diferentes, são então clonados em fagomídeo. Após a construção da biblioteca, essa pode ser utilizada para seleção de anticorpos contra qualquer antígeno.

O processo de seleção de anticorpos começa com a transformação da biblioteca de Phage Display em uma linhagem de *E. coli* que possua o pilo sexual. Então, após o período de recuperação é adicionado o fago Helper, que possui o resto das estruturas necessárias para a construção da partícula viral (Figura 14).

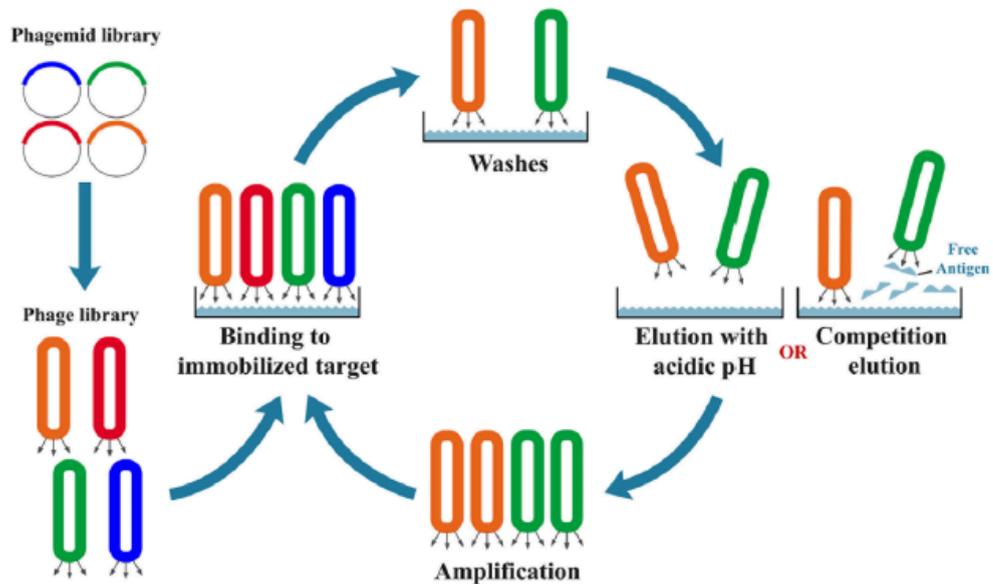


Figura 14. Representação do processo de seleção de anticorpos por Phage Display. Uma biblioteca codificando milhares de fragmentos de anticorpos é utilizada para gerar fagos de fusão com fragmentos de anticorpos humanos em suas superfícies. São realizados vários ciclos de seleção, aumentando a estringência em cada ciclo por meio do aumentando o número de lavagens. Duas estratégias de eluição são representadas. Uma delas usando uma solução ácida para desfavorecer a ligação anticorpo-antígeno. A outra utilizando uma solução saturada do peptídeo antigênico. Os fagos eluídos são amplificados separadamente para uma nova rodada de seleção. Adaptado de FRANÇA, *et al.*, 2022.

Os fagos com os fragmentos de anticorpos na superfície são utilizados para a seleção contra um antígeno específico. O antígeno pode ser imobilizado ou não. Após a ligação dos fagos específicos para o antígeno, ocorre a lavagem, na qual fagos não ligantes são retirados. Então, os fagos ligantes são eluídos e utilizados para um novo ciclo de seleção.

2. JUSTIFICATIVA

O surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 voltou a trazer preocupação sobre a pandemia, já que algumas delas se mostraram mais infectivas e até mesmo foram relacionadas a casos de reinfecção. Ensaios de neutralização com pseudovírus também demonstraram quedas na capacidade de neutralização do soro de pacientes vacinados com vacinas de mRNA e também de pacientes convalescentes. Essa queda foi bastante expressiva para variantes que contém as seguintes mutações dentro da RBD: E484K, K417T/N e N501Y (GARCIA-BELTRAN, *et al.*, 2021; SANTOS, *et al.*, 2021). Estudos com anticorpos isolados do plasma de pacientes convalescentes e vacinados demonstram que esses anticorpos elicitados tanto pela vacinação como que pela infecção natural são sensíveis a mutações nos sítios E484, K417 e N501 (WANG, *et al.*, 2021). Anticorpos monoclonais como o bamlanivimab, casirivimab, sotrovimab e imdevimab foram retirados do uso clínico devido a baixa eficácia diante da variante Omicron (AGGARWAL, *et al.*, 2023; MAWAZI, *et al.*, 2021; VASIREDDY, *et al.*, 2021). Até mesmo as vacinas que foram desenvolvidas para a prevenção da COVID-19 tiveram que ser atualizadas para oferecer proteção contra as variantes.

Nessa perspectiva, evidenciamos a necessidade de se buscar selecionar anticorpos contra epítomos imunodominantes além da RBD, de forma produzir um possível anticorpo terapêutico capaz de tratar casos de COVID-19 e que seja menos sensível ao surgimento de novas variantes.

De preferência, esses epítomos devem ser derivados de uma região bastante conservada entre as variantes do SARS-CoV-2 para aumentar seu espectro curativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi selecionar, expressar e caracterizar fragmentos de anticorpos isolados de bibliotecas combinatórias em fagos, contra o Peptídeo de Fusão do SARS-CoV-2.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Selecionar anticorpos anti-Peptídeo de fusão por Phage Display;
- b) Estabelecer um protocolo de expressão e purificação eficiente para os fragmentos scFv em *Escherichia coli*;
- c) Avaliar a ligação dos fragmentos scFv contra o peptídeo de fusão e também contra a partícula viral inativada;
- d) Aferir a capacidade dos fragmentos scFv de neutralização do vírus *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. O Peptídeo de Fusão Mimético

Para o desenho do peptídeo de fusão mimético, foi utilizado a sequência da região do Peptídeo de Fusão do vírus original de Wuhan. Foi realizada a síntese química pela empresa. O peptídeo foi dissolvido em PBS na concentração de 5 mg/ml.

4.2. Proteínas S e Partícula Viral Inativada

A Proteína S da variante Gama e Delta foram gentilmente cedidas pela Dra Leda Castilho (UFRJ). A partícula viral do SARS-CoV-2 original de Wuhan foi gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Viera (Unicampi).

4.3. Biblioteca de Genes de Fragmentos de Anticorpos

Foi utilizada uma biblioteca de genes de fragmentos de anticorpos humanos no formato Fab fusionados ao gene da proteína III do capsídeo viral (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca pode ser considerada naïve em relação ao antígeno utilizado na seleção.

4.4. Linhagens Celulares

A *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' (Stratagene, California, EUA, cat: 200230) foi utilizada para transformação por meio de choque térmico ou elétrico e em seguida para a multiplicação de DNA plasmidial por meio de Minipreparação ou Midipreparação. A linhagem de *Escherichia coli* Shuffle pLys Y (New England Biolabs, Ipswich, EUA, cat: C3030J) foi utilizada para a expressão dos Fragmentos de anticorpos no formato scFv sendo que estes foram clonados no vetor pET-Sumo.

4.4.1. Transformação por Choque Térmico

Para o processo de transformação por choque térmico uma colônia isolada de *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' (Stratagene, California, EUA, cat: 200230) ou *Escherichia coli* Shuffle pLys Y (New England Biolabs, Ipswich, EUA, cat: C3030J) foi crescida em 5 mL de meio LB com 10 µg/mL de tetraciclina ou cloranfenicol à 20 µg/mL. A cultura foi incubada durante a noite em um *Shaker* a 280 RPM, 37°C. No dia seguinte 1 mL dessa cultura foi semeada em 100 ml de meio LB, e em seguida a cultura foi mantida no *Shaker* até atingir a densidade óptica (D.O.) a 600 nm de 0,1 a 0,3. Então, a cultura foi centrifugada a 3000 x g, a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas por meio de agitação suave com 10 ml de uma solução de cloreto de cálcio

gelada. Novamente as células foram centrifugadas nas mesmas condições que anteriormente. As células foram por fim ressuspensas em 1 ml de solução de cloreto de cálcio gelada e mantidas no gelo por 1 hora, e a partir de então estavam termocompetentes. As células termocompetentes foram incubadas com 320 ng do DNA plasmidial de interesse por 30 minutos no gelo. Foi realizado o choque em banho maria por 5 minutos a 37° C. As células foram imediatamente recuperadas após o choque com 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora. Finalmente, foram semeadas 50 µl, 100 µl, 300 µl em placas de meio LB Agar com 30 µg/mL de kanamicina. As placas foram mantidas numa estufa a 37°C durante a noite e retiradas no dia seguinte. A quantidade de colônias foi contada e a eficiência da transformação foi calculada.

4.4.2. Transformação por Choque elétrico

Para o processo de transformação por choque elétrico uma colônia isolada de *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' foi crescida em 5 mL de meio SB durante a noite sob agitação de 250 RPM a 37°C. Quinhentos microlitros dessa cultura foi adicionada em 500 mL de meio SB (Peptona 3%; Extrato de levedura 2%; MOPS1%; pH 7,0) contendo 2,5 mL de solução estoque de glicose 2 M e 2,5 mL de solução estoque de Mg 2 M e a cultura foi incubada sob agitação de 250 RPM a 37°C até atingir a densidade óptica (D.O) a 600 nm de 0,7 a 0,9. A cultura foi resfriada em gelo picado antes de ser submetida a centrifugação. A cultura foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado com pipetas previamente resfriadas. Foram adicionados mais 75 mL de glicerol 10% gelado e as células foram centrifugadas nas mesmas condições que anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais uma vez. Novamente, as células foram ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado e centrifugadas a 3000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas para uma densidade óptica a 600 nm de 200 a 250 com aproximadamente 1 mL de glicerol 10%. A partir desse momento as células estavam eletrocompetentes, e algumas alíquotas de 100 µL foram feitas e congeladas em banho de álcool/ gelo seco, e armazenadas a -80 °C.

Para o choque elétrico, um microtubo de centrifugação contendo 100 ng a 500 ng do DNA foi resfriado em gelo picado juntamente com as cubetas de eletroporação (Sigma-Aldrich, cat: Z706086-50EA). Uma alíquota de células eletrocompetentes foi retirada do freezer -80 °C, e foi descongelada no gelo. Logo após o descongelamento, 100 µL de células eletrocompetentes foram gentilmente incubadas com o DNA. A mistura foi transferida

para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm que foi submetida ao choque elétrico nas seguintes condições: 2,5 kV; 25 μ F e 200 Ω . Imediatamente após o choque, foi realizada a lavagem da cubeta com 3 mL de meio SOC (Peptona 2%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,06%; KCl 0,02%; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; pH 7,0). A cultura de células transformadas foi incubada sob agitação de 250 RPM a 37 °C por 1 hora e meia. Diluições de 0,1, 1 e 10 μ L foram semeadas em placas contendo meio LB ágar e a marca seletiva do plasmídeo. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite e no dia seguinte a eficiência de transformação foi calculada.

4.4.3. Seleção dos scFvs Por Phage Display

Para o processo de seleção dos scFvs foi utilizada a técnica de Phage Display. Na seleção foi utilizada uma biblioteca de genes de fragmentos de anticorpos humanos no formato Fab fusionados ao gene da proteína III do capsídeo (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). A biblioteca, contendo cerca de $1,7 \times 10^8$ formas diferentes, foi clonada no vetor pComb3XSS de Phage Display, e foi transformada em células XL1-BLUE MRF' eletrocompetentes com uma eficiência de $\sim 1 \times 10^9$ CFU/ μ g. O choque elétrico foi realizado por 10 vezes utilizando 100 μ L de célula eletrocompetente e 1 μ L da biblioteca em cada choque. A eletroporação foi realizada utilizando cubetas de 0,2 cm e as seguintes condições: 2,5 kV; 25 μ F e 200 Ω . Após o choque, cada cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC (Peptona 2%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,06%; KCl 0,02%; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; pH 7,0) e aos 30 mL resultantes foi adicionado 20 mL de meio SB (Peptona 3%; Extrato de levedura 2%; MOPS 1%; pH 7,0) com glicose para uma concentração final de 1%. A cultura foi mantida sob agitação durante 1 hora a 37 °C e 250 RPM. Após 1 hora foi adicionado 10 μ L da solução estoque de carbenicilina na concentração de 100 mg/mL e a cultura foi mantida sob agitação de 300 RPM por uma hora a 37 °C. Novamente foi adicionado 15 μ L da solução estoque de carbenicilina na concentração de 100 mg/mL e a cultura foi incubada nas mesmas condições. Foi então adicionado a cultura 148 mL de meio SB com 75 μ L de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL, 300 μ L de solução estoque de tetraciclina 5 mg/mL, glicose para a concentração final de 1% e 2 mL fago helper VCSM13 (10^{12} a 10^{13} pfu/mL) foram adicionados a cultura que foi mantida sob agitação de 300 RPM a 37 °C por 2 horas. Ao final do dia, 280 μ L de solução estoque de kanamicina 50 mg/mL foi adicionada à cultura que foi então mantida sob agitação de 300 RPM durante a noite a 37 °C.

A plataforma utilizada para seleção dos fagos foi uma placa de ELISA (Thermo Fisher Scientific, cat: 456529). A placa de ELISA foi sensibilizada com 100 μ L de Estreptavidina a

5 µg/mL diluída em PBS durante 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada por 3 vezes com 200 µL de TBST (TBS, Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5; acrescido de Tween 0,1%). Em seguida foi adicionado 100 µL do Peptídeo de Fusão mimético do SARS-CoV-2 conjugado a biotina em uma concentração de 4 µg/mL. A placa foi incubada novamente nas mesmas condições. O bloqueio foi feito com 200 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) em TBS durante a noite a 4 °C.

No dia seguinte, a cultura contendo os fagos com fragmentos de anticorpos na superfície foi centrifugada a 3000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os fagos foram precipitados com 8 g de PEG 8000 e 6 g de NaCl. A cultura foi mantida sob agitação de 300 RPM por 5 minutos e em seguida foi mantida no gelo por 30 minutos. A cultura foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os Fagos foram ressuspensos em 2 mL de BSA 1% em TBS. A placa de ELISA foi novamente lavada com TBST nas mesmas condições e 100 µL do fago foi adicionado em cada poço em duplicata. Como pretendíamos realizar dois mecanismos de eluição, a quantidade de poços sensibilizados com o antígeno e incubadas com o fago foi dobrada. A incubação com os fagos (*fagos input*) foi feita por 2 horas a 37 °C.

No primeiro ciclo de seleção foram realizadas 5 lavagens para remoção dos fagos não ligantes. A lavagem foi feita por meio da pipetagem vigorosa de 200 µL de TBST, e em cada lavagem foi feito um intervalo de 5 minutos e então a solução de lavagem era removida por aspiração. no segundo ciclo de seleção foram feitas 10 lavagens, no terceiro e quarto round foram feitas 15 lavagens. Os fagos ligantes ao antígeno foram eluídos (*fagos output*) por 2 formas, uma eluição feita com usando 100 µL de solução de Glicina-HCl 100 mM pH 2,2 e outra eluição com 100 µL do Peptídeo de Fusão mimético do SARS-CoV-2 sem biotina na concentração de 8 µg/mL. Em cada uma das respectivas eluições, a solução de eluição era incubada por 10 minutos e depois eram realizados 10 up/down.

Para começarmos um novo ciclo de seleção, os fagos que foram eluídos anteriormente eram reaplicados. Para isso, 2 mL de cultura de XL1-BLUE com densidade óptica a 600 nm de 1,0 eram infectadas com 100 µL de fagos eluídos (*fagos output*) por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, 6 mL de meio pré-aquecido a 37 °C contendo glicose na concentração final de 1%, 1,6 µL de carbenicilina 100 mg/mL e 16 µL de tetraciclina 5 mg/mL foram adicionados aos 2 mL de cultura de XL1-BLUE infectados com o fago. A cultura foi incubada a 300 RPM a 37 °C por 1 hora. Após o período de 1 hora mais 2,4 µL de carbenicilina 100 mg/mL foram adicionados à cultura que foi incubada nas mesmas condições por mais 1 hora. Então foi adicionada a cultura 91 mL de meio SB contendo 1% de glicose,

46 µL de carbenicilina 100 mg/mL, 184 µL de tetraciclina 5 mg/mL e 1 mL de de fago helper VCSM13 (10^{12} a 10^{13} pfu/mL). a cultura foi novamente incubada a 300 RPM, 37 °C por 2 horas. Então foi adicionado 140 µL de kanamicina 50 mg/mL e a cultura foi mantida sob agitação de 300 RPM a 37 °C durante a noite. No dia seguinte a cultura contendo o fagos com os fragmentos de anticorpos na superfície foi processada como descrito anteriormente e os fagos foram utilizados nos ciclos de seleção seguintes.

Em cada um dos 4 ciclos de seleção foi realizada a titulação dos fagos. Para a titulação dos fagos *input*, 100 µL de células XL1-BLUE MRF' com D.O. a 600 nm de 1,0 foram infectadas com diluições de 10^8 , 10^9 e 10^{10} de fagos amplificados e ressuspensos em BSA 1% por 15 minutos. As células foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 1 % de glicose e carbenicilina a 100 µg/mL e foram incubadas a 37 °C durante a noite. Para a titulação do *output*, 2 mL de células XL1-BLUE MRF' com D.O. a 600 nm de 1,0 foram infectadas com 100 µL de fagos eluidos por 15 minutos. Após a infecção 100 µL de células infectadas nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 1 % de glicose e carbenicilina a 100 µg/mL e foram incubadas a 37 °C durante a noite.

4.4.4. Minipreparação

Para a extração de DNA plasmidial em pequena escala foi utilizado o QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, cat:27106). Uma colônia isolada de células *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' previamente transformadas com o plasmídeo de interesse foi inoculada em 5 ml de meio LB. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 7000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250 µL de Buffer P.1. Em seguida foram adicionadas 250 µL de Buffer P2 e o sistema foi misturado por inversão 10 vezes e incubado no gelo por 5 minutos. Foram adicionados ao sistema 350 µL de Buffer N3, e o mesmo foi vertido 10 vezes e incubado no gelo por 10 minutos e, em seguida, centrifugado a 17900 x g e 4 °C por 15 minutos. A fração insolúvel foi descartada e o sobrenadante foi depositado na coluna QIAprep 2,0 que logo em seguida foi centrifugada a 17900 x g e 4 °C por 1 minuto. A coluna foi lavada duas vezes com 750 µL de Buffer PE, e foi centrifugada nas mesmas condições. Por fim o DNA foi eluído com 30 µL de água milli-q aquecida a 60 °C.

4.4.5. Midipreparação

Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o QIAprep Spin Midiprep kit

(QIAGEN, cat: 12145). uma colônia isolada de células *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF^r previamente transformadas com o plasmídeo de interesse foi inoculada em 5 mL de meio LB. Dessa cultura 200 µL foram adicionados em 100 mL de meio LB e incubado a 300 RPM e 37°C durante a noite.

. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 7000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a células foram ressuspensas em 5 mL de Buffer P.1. Foi adicionado então 5 mL de Buffer P.2 (tampão de lise) e o frasco foi vertido gentilmente por 10 vezes e foi mantido no gelo por 5 minutos, quando então foi adicionado 5 mL do Buffer P.3 (tampão de neutralização). O sistema foi novamente vertido e incubado no gelo por 10 minutos.

O sistema foi centrifugado a 12000 x g por 1 hora a 4° C. O sobrenadante foi depositado na coluna QIAGEN-tip 100, que havia sido equilibrada com 4 ml do Buffer QBT. O sobrenadante passou pela coluna por gravidade. A coluna foi lavada 2 vezes com 10 mL de Buffer QC. E então DNA foi eluído com 5 mL de Buffer QF previamente aquecida a 60 °C e, em seguida, precipitado com 3,5 mL de isopropanol e 30 µL de Glycoblue 15 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, cat: AM9516) por centrifugação a 20000 x g e 4 °C por 30 min. O precipitado foi lavado cuidadosamente com 2 mL de etanol 70% gelado, evitando ressuspender o precipitado, e centrifugado a 20000 x g e 4 °C por 10 minutos, e, em seguida, secado por exposição ao ar por 10 minutos. Por fim, o DNA precipitado foi ressuspendido com 100 µL de milli-q.

4.5. Amplificação dos domínios variáveis

Os genes codificadores do VH e VL de anticorpos selecionados durante o Phage Display foram amplificados separadamente por reação em cadeia da Polimerase (PCR). O DNA da biblioteca e dos rounds de seleção foram utilizados como molde. A reação de PCR foi feita no no termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems, cat: 4375786). Os oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados para amplificação do VH e VL estão indicados na tabela abaixo.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do VH e VL

Oligonucleotídeo Senso VH	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG ACAGGGCTGCCCAACCAGCCATGGCC
Oligonucleotídeo Senso VL	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG ACAGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC

Oligonucleotídeo Reverso	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT.
Oligonucleotídeo complementar a região ompA	GCTGCCCAACCAGCC ATGGCC
Oligonucleotídeo complementar a região final do domínio CH1:	AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC

Esses oligonucleotídeos se ligam em regiões específicas do cassete de expressão dentro do pComb3XSSFab (Figura 15). Os oligonucleotídeos para amplificação do VL se ligam na região do peptídeo líder ompA, que está posicionado anteriormente ao VL, e na região inicial do domínio C kappa, que está imediatamente após o VL. Já para o VH, os oligonucleotídeos se ligam ao pelB que está posicionado antes do VH, e na região inicial do CH1 que está posicionado após o VH.

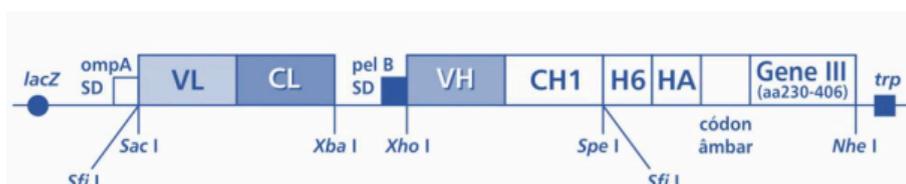


Figura 15. Cassete de expressão do Fab no vetor pComb3XSSFab. Cassete de expressão de Fabs fusionados ao gene III do fago filamentosso M13, ligado ao fagomídeo pComb3XSSFab que foi utilizado na seleção por Phage Display. ompA representa o Peptídeo Líder A, pelB representa o peptídeo Líder B.

Excepcionalmente para a amplificação do VH do ciclo 4 da seleção ácida foi utilizado o DNA extraído do fago com oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de todo o Fab. O oligonucleotídeos eram complementares a região ompA e ao final do domínio CH1 (Tabela 3)

Para a PCR foi utilizada a *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermofisher, Ref: 10966-030). Para cada reação foi utilizado 2,5 U da *Platinum Taq DNA Polymerase*, DNA molde na concentração de 20 ng, dNTP na concentração de 0,2 mM, tampão na concentração de 1x, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 0,4 μM e solução de MgCl₂ na concentração de 2,5 mM. O ciclo de amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 5 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos por 1 minuto a 58 °C, extensão a 72 °C por 1 minuto. Em seguida foi

realizado 22 ciclos de de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C e extensão final por 4 minutos.

4.6. Purificação e Eluição dos fragmentos de DNA amplificados por PCR

Os produtos das PCRs para amplificação do VH e VL foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. As bandas com tamanho correspondente ao VH e VL foram cortadas do gel de agarose e o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, cat: 28704) foi utilizado para eluir o DNA do gel de agarose. As bandas de DNA foram dissolvidas em 6 volumes de Buffer QG por 10 minutos a 50 °C. Um volume de isopropanol foi adicionado à mistura que foi aplicada na QIAquick spin. A coluna foi submetida a centrifugação a 17000 x g por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 500 µL de buffer QG. Foi adicionado a coluna 750 µL de buffer PE que ficou em incubação por 5 minutos, e então a coluna foi novamente centrifugada nas mesmas condições que anteriormente. Para eluir o DNA, 30 µL de água milliq a 60 °C foram adicionados à coluna por 5 minutos e então a coluna foi centrifugada a 17000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente.

4.7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Os domínios da cadeia leve e pesada dos anticorpos selecionados pelo Phage Display do ciclo 4 de seleção e da biblioteca antes da seleção foram analisados por meio de sequenciamento de nova geração na plataforma de Illumina. Para o sequenciamento, os mesmos oligonucleotídeos que foram usados na amplificação dos domínios variáveis foram utilizados (Tabela 3).

4.8. Análise do Sequenciamento de Nova Geração no ATTILA

Os resultados do sequenciamento foram analisados na ferramenta de bioinformática denominada ATTILA (MARANHÃO, *et al.*, 2020). O programa ATTILA analisa as sequências de VL e VH que foram enriquecidas durante o processo de seleção por Phage Display. Para isso, é analisada a frequência de cada sequência de VL e VH em cada ciclo de seleção, e no final é emitido um relatório com a variação da frequência de cada sequência (fold-change) comparando o ciclo de seleção e a biblioteca antes da seleção.

4.9. Desenho dos Genes para expressão em células de Bactérias

Os genes codificadores dos VHs e VLs que foram previamente selecionados por meio da técnica de Phage Display foram combinados para gerar dois scFvs que foram denominados como Aca e Acp. Ambos os fragmentos utilizavam o mesmo VH e diferiam no VL.

A sequência gênica que codifica os fragmentos de anticorpos com um *linker* conector foram colocados no vetor de expressão pET-SUMO. Os vetores pET utilizam o promotor T7 de bacteriófagos, que é considerado um promotor forte. A expressão foi colocada sob controle do operon-lac. Na extremidade amino-terminal foi adicionada uma *tag* de seis histidinas (His-tag) e na extremidade carboxi-terminal foi adicionada uma *tag* de HA (Hemaglutinina). A síntese dos genes foi realizada por uma empresa externa ao nosso laboratório.

4.10. Digestão Enzimática dos Plasmídeos

Foi realizada uma digestão enzimática para confirmação dos plasmídeos pET-SUMO contendo o Aca e Acp. Para isso, foi utilizada a endonuclease BamHI-HF (NEB, #R316S) para a linearização dos plasmídeos e confirmação do tamanho dos fragmentos por gel de eletroforese. Para cada amostra foi feita a seguinte reação: 4 µL do plasmídeo extraído, 1 µL da enzima BamHI-HF, 4 µL do Buffer CutSmart (NEB, cat: #B7204S) e água Milli-Q para um volume final de 40 µL. Esta reação foi incubada a 37°C por 4 horas. Em seguida, 4 µL de azul de bromofenol (Azul de bromofenol 0,041%, Sacarose 6,67%) foram adicionados a 20 µL das digestões. As digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

4.11. Eletroforese em Gel de Agarose

Para análise de amostras de DNA foi realizada a Eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado nas concentrações 0,8% - 1,2% com adição de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL). Para preparação do gel e corrida foi utilizado o tampão TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido Acético Glacial 20 mM, EDTA 10 mM pH 8,0). As amostras previamente preparadas foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em corrente de 30-70 volts. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por meio da comparação ao marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, cat: 10787018). A quantificação foi feita por densitometria, utilizando o marcador High Mass Ladder (Invitrogen, cat: 10496016). alternativamente, a quantificação também foi feita pelo NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.12. Expressão dos scFvs em Shuffle p Lys Y

4.12.1. Padronização da Expressão

Para a padronização da expressão foram testadas 5 diferentes condições de expressão: condição de cultura 1, 20 ml de meio de cultura TB eram inoculadas com uma diluição de 1:60 de uma cultura crescida no período *overnight* e eram crescidas até uma D.O de 2,0 e então era adicionada IPTG para uma concentração de 1 mM. A cultura ficou sob agitação durante 4 horas a 200 RPM a 20°C. Ao final das 4 horas a cultura era centrifugada a 9000 x g e ressuspensa no tampão de fosfato e então congelada. No dia seguinte a amostra foi submetida ao processo de sonicação para lise celular e em seguida foi feita a análise por *SDS-Page e Western blot*; na condição 2 foi realizado o mesmo procedimento da condição 1, entretanto após a centrifugação as células foram armazenadas e só ressuspensa no tampão de fosfato no momento da sonicação; na condição 3, foi realizado o mesmo procedimento da condição 1, porém foi adicionado glicose na concentração de 1% durante o crescimento e após a cultura atingir a D.O de 2,0 esta foi centrifugada e ressuspensa em 20 ml de meio TB com IPTG na concentração final de 1mM; na condição 4 foi realizado o mesmo procedimento, entretanto não houve a troca de meio de cultura para a adição do IPTG. Na condição 5 a cultura ficou crescendo no período *overnight* e não até atingir a D.O de 2,0. No dia seguinte, a cultura foi induzida com IPTG na concentração final de 1mM e foi incubada a 200 RPM por 4 horas a 20°C. As diferentes preparações foram sonicadas, centrifugadas e analisadas por meio de *SDS-Page e Western-blot* (Figura 22).

A melhor condição de expressão observada foi a 4, na qual foi adicionada glicose na concentração final de 1% durante o crescimento até O.D de 2,0 seguida da indução com IPTG 1 mM com o tempo de expressão de 4 horas a 20°C a 200 RPM. Portanto, essa foi a condição de produção adotada para a expressão. A expressão foi realizada então com 200 mL de meio TB em um erlenmeyer de 1 litro. Após a produção, a cultura era centrifugada a 9000 x g por 15 minutos a 4°C. A fração insolúvel era ressuspensa com 30 ml de tampão de fosfato e 10 µl do coquetel de inibidor de proteases era adicionado e 20µl de PMSF. a cultura era sonicada e centrifugada novamente a 12000 x g por 2 horas.

4.12.2. Seleção dos clones produtores

Colônias isoladas da Shuffle p Lys Y colhidas em uma placa de meio LB ágar com 30 µg/mL de kanamicina, as quais haviam sido previamente transformada por choque térmico com o vetor de expressão com os genes do Aca e Acp foram repicadas em 2 placas, ambas contendo kanamicina. Em uma das placas havia glicose 1% enquanto que na outra havia IPTG na concentração de 1mM. As colônias foram repicadas nas duas placas na mesma ordem e as placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

No dia seguinte foi feita a análise de quais colônias haviam crescido. O seguinte critério foi utilizado na classificação das colônias como boas produtoras: aquelas colônias que cresceram bem na placa contendo IPTG e na de glicose também foram consideradas boas produtoras.

4.12.3. Produção dos scFvs

Uma colônia isolada de um clone bom produtor de cada scFv foi adicionado a 5 mL de meio de cultura TB (Extrato de levedura 2,4%, Peptona 2%, glicerol 0,4 %) com 10% de Tampão de Fosfato (K_2HPO_4 0,72 M e KH_2PO_4 0,17 M). A cultura foi mantida sob agitação de 280 RPM a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, uma cultura de 200 mL de meio TB foi inoculada com uma diluição de 1:60 da cultura crescida durante a noite. Ao inóculo foi adicionado também glicose na concentração de 1% e kanamicina a 20 µg/mL. A cultura ficou incubada a 280 RPM e 37 °C até atingir uma densidade óptica (D.O) a 600 nm de 2,0.

Nesse momento, foi realizada a indução da produção, adicionado o agente indutor do operon-lac, o análogo da lactose IPTG em uma concentração de 1mM. A cultura foi então incubada na temperatura de 20 °C e 200 RPM por 4 horas. Após esse período de produção, a cultura foi centrifugada a 9000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fração solúvel foi descartada e a fração insolúvel foi armazenada para as análises seguintes.

4.12.4. Preparo das Amostras por Sonicação

As frações insolúveis da produção foram ressuspensas em 20-25 ml de tampão de ligação (Fosfato de sódio monobásico 50mM e Cloreto de Sódio 300 mM, pH 8,0) contendo coquetel inibidor de proteases diluído 100x. Todo o processo de ressuspensão foi feito no gelo. Após toda fração insolúvel ter sido ressuspensa, foi realizado o processo de rompimento de células por sonicação.

As condições utilizadas no sonificador foram as seguintes: Amplitude de 50, tempo de pulso de 10 segundos, tempo desligado 1 minuto e 20 segundos, tempo de processo 1 minuto e 20 segundos. Foram realizados de 4 a 5 ciclos nessas condições. Após o processo de sonicação ser concluído, o produto da sonicação foi centrifugado a 12000 x g por 2 horas a 4 °C. Em seguida o pH da amostra foi ajustado para 8,0 e a amostra foi filtrada com uma membrana de 0,22 µm.

4.12.5. Purificação por afinidade ao Níquel

A purificação dos scFvs foi realizada no Akta Pure com a coluna HISTRAP HP 1 mL (Cytivia, cat: 17524701). A coluna HISTRAP HP 1 mL é constituída de uma resina que

contém o metal níquel. Os scFvs possuíam em sua estrutura uma His-tag, a qual tem afinidade pelo níquel e portanto ao passar pela coluna os scFvs ficavam retidos na coluna.

Para a purificação, a coluna HISTRAP HP 1 mL foi previamente equilibrada com 25 mL de tampão de ligação (Fosfato de sódio monobásico 50mM e Cloreto de Sódio 300 mM, pH 8,0) em uma velocidade de 500µl/min. Iniciou-se então o processo de aplicação da amostra utilizando o *superloop* carregado com 30 ml da amostra. Coletamos o *Flow-Through* (aquilo que passou pela coluna) pela válvula de Outlet.

Quando os 30 ml de amostra foram passados, iniciamos a lavagem coluna com 20 mL de tampão de ligação contendo 10 mM de Imidazol seguidos de 10 mL de tampão de ligação contendo 50mM de imidazol. Para o scFV Acp realizamos a lavagem com 100 mM de imidazol. coletamos toda a lavagem pela válvula de outlet.

Por fim as proteínas foram eluidas da coluna por meio de um gradiente em steps de 100 mM de imidazol a 500 mM. Para o anticorpo Acp foi utilizado 300 mM a 500 mM de imidazol. Foram coletadas frações de 1ml por meio da válvula Frac conectada ao coletor de frações. Após a purificação a coluna foi equilibrada novamente com 25 mL de tampão de ligação e lavada com 40 ml de água milliq. Foi realizada uma lavagem com 15 mL de álcool antes da coluna ser retirada e armazenada a 4°C. As frações eluidas durante a purificação foram analisadas em um gel desnaturante de poliacrilamida.

4.12.6. Gel Não Desnaturante de Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi feito utilizando o sistema *Mini-Protean Tetra cell, 4-gel System*. O gel separador foi preparado a 12% (3 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 5µL de TEMED; 100 µL de APS 10% e água destilada para um final de 10 mL) os catalisadores TEMED e APS foram os últimos reagentes a serem adicionados por serem os catalisadores da polimerização. Após a adição dos catalisadores da polimerização, o gel foi adicionado rapidamente as placas de vidro e foi adicionado isopropanol sobre o gel. Após a polimerização, o isopropanol foi removido e o gel foi lavado suavemente com água destilada. Em seguida foi feito o gel concentrador a 5% (470 µL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 472,5 µL de Tris-HCL 1,0 M pH 6,8; 4 µL de TEMED; 37,5 µL de APS 10% e água destilada para o volume final de 3,7 mL). Após a adição dos catalisadores da polimerização, o gel concentrador foi adicionado sobre o separador e o pente foi rapidamente colocado. Para a corrida no gel não redutor, um tampão de amostra sem o

agente betamercaptoetanol e sem SDS.

4.12.7. Gel Desnaturante de Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi feito utilizando o sistema *Mini-Protean Tetra cell, 4-gel System*. O gel separador foi preparado a 12% (3 mL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 5µL de TEMED; 100 µL de APS 10% e água destilada para um final de 10 mL) os catalisadores TEMED e APS foram os últimos reagentes a serem adicionados por serem os catalisadores da polimerização. Após a adição dos catalisadores da polimerização, o gel foi adicionado rapidamente as placas de vidro e foi adicionado isopropanol sobre o gel . Após a polimerização, o isopropanol foi removido e o gel foi lavado suavemente com água destilada. Em seguida foi feito o gel concentrador a 5% (470 µL de acrilamida/ bisacrilamida (29:1); 472,5 µL de Tris-HCL 1,0 M pH 6,8; 37,5 µL de SDS 10%; 4 µL de TEMED; 37,5 µL de APS 10% e água destilada para o volume final de 3,7 mL). Após a adição dos catalisadores da polimerização, o gel concentrador foi adicionado sobre o separador e o pente foi rapidamente colocado.

4.12.8. Condições de Corrida

Após a polimerização do gel, foi montado o sistema para a corrida. A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão de corrida 1X (Tris 25 mM; glicina 0,192 M; SDS 0,1% (p/v); pH 8,3 - 8,4). As amostras foram preparadas com a adição do tampão de amostra 5x (Tris-HCl 200 mM pH 6,8 SDS 4% (v/v); β-mercaptoetanol 4% (v/v); Glicerol 20% (v/v); Azul de Bromofenol 0,1% (p/v)) para uma concentração de 1x e em seguida foram fervidas por 10 minutos. Cerca de 20 µL das amostras foram adicionadas ao gel juntamente com 3,5 µL do marcador de peso molecular Blueye™ Prestained Protein Ladder (Sigma Scientific, Waltham, MA, EUA). A corrente de 100 V foi aplicada ao gel por 2 horas e 15 minutos.. A migração pelo gel foi acompanhada pelo Azul de Bromofenol presente no tampão de amostra. Após a corrida, o gel seguiu para coloração com Coomassie Blue ou Prata, e imunodeteção por Western Blot.

4.12.9. Coloração do gel de Poliacrilamida com Coomassie Blue

Após a corrida, o gel concentrador foi removido e descartado e o gel separador foi corado com Solução Corante de Coomassie Blue (Azul Brilhante de Coomassie R-250 0,25% (p/v); Metanol 30% (v/v); Ácido Acético Glacial 7% (v/v)] pelo período de duas horas sob leve agitação. Logo após, a Solução Corante foi descartada e foi adicionada a Solução Descorante (Metanol 30% (v/v); Ácido Acético Glacial 7% (v/v)). O gel foi mantido na solução descolorante até que fosse possível visualizar as bandas de proteínas.

4.12.10. **Coloração do gel com prata**

Após a corrida do gel, o gel concentrador foi descartado e o gel separador foi corado com prata utilizando o kit de coloração com prata da Invitrogen (Invitrogen, Ref: 45-1001). Durante todas as etapas o gel foi mantido sob agitação suave. Inicialmente o gel foi fixado com 25 mL da solução fixadora (40% de etanol; 10% de ácido acético; água destilada para o volume final de 25 mL) por 20 minutos. O gel foi então lavado com 25 mL de etanol (30%) por 10 minutos.

O etanol (30%) foi descartado e foram adicionado 25 mL da solução de sensibilização (7,5 mL de etanol; 2,5 mL de solução sensibilizadora; água destilada para o volume final de 25 mL. o gel foi incubado na solução de sensibilização por 10 minutos. A solução foi descartada e o gel foi novamente lavado com etanol (30%) por 10 minutos. Em seguida o gel foi lavado com água destilada por 10 minutos.

A água foi descartada e 25 mL da solução de coloração (250 μ L de corante; água destilada para o volume de 25 mL) foi adicionada por 15 minutos. O gel foi lavado novamente com água destilada por 60 segundos. A água foi descartada e a solução de revelação (2,5 mL de revelador; uma gota do amplificador de revelação) foi adicionada por 4 a 8 minutos até que as bandas começaram a aparecer. Quando as bandas já estavam coradas até uma intensidade necessária, foi adicionada a solução Stopper. Após a parada da reação, as soluções foram descartadas e o gel mantido em água destilada.

4.13. **ELISA**

4.13.1. **ELISA Contra o Peptídeo de Fusão Mimético**

Para análise da ligação do scFvs ao Peptídeo de Fusão mimético foi realizado o ensaio de ELISA indireto. Uma placa de 96 poços (Corning, Ref:3595) foi sensibilizada com 100 μ l da solução contendo o Peptídeo de Fusão na concentração de 20 μ g/ml, a placa foi mantida a 4°C durante a noite e a 37°C por uma hora no dia seguinte. Foram realizadas lavagens com 200 μ l de PBST por três vezes. Em seguida foi realizada a etapa de bloqueio com BSA 1% diluído em PBST que foi previamente filtrada com uma membrana de 0,22 μ m. Foram adicionados 200 μ l em cada poço da placa que foi incubada à 37°C por 1 hora.

Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por 3 vezes com 200 μ l de PBST e foram adicionados os scFvs em uma diluição seriada começando em 243 μ g/ml até 0 μ g/ml. Da mesma maneira foi adicionado um scFv contra um antígeno não relacionado como controle negativo. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C novamente.

A placa foi lavada novamente nas mesmas condições que anteriormente, e foi adicionado o Anti-His (Invitrogen, cat: A5588) na diluição de 1:2000 em TBST. Foram adicionados 100 µl do Anti-His em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada novamente nas mesmas condições.

Momentos antes da revelação, foi preparada a solução de revelação contendo o PNPP diluído em APB em uma concentração de 5 mg/mL. Foi adicionado 100 µL em cada poço e aguardamos 5 minutos para realizar a leitura da placa a 405 nm. Os dados obtidos foram utilizados para plotagem de gráficos no programa Graphpad.

4.13.2.ELISA Contra a Proteína S das variantes do SARS-CoV-2

Para análise da ligação do scFvs a Proteína S das variantes Delta e Gama foi realizado o ensaio de ELISA indireto. Uma placa de 96 poços (Coarning, Ref:3595) foi sensibilizada com 100 µl da solução contendo a Proteína S na concentração de 2,5-5 µg/ml, a placa foi mantida a 4°C durante a noite e a 37°C por uma hora no dia seguinte. Foram realizadas lavagens com 200 µl de PBST por três vezes. Em seguida foi realizada a etapa de bloqueio com BSA 1% diluído em PBST que foi previamente filtrada com uma membrana de 0,22 µm. Foram adicionados 200 µl em cada poço da placa que foi incubada à 37°C por 1 hora.

Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por 3 vezes com 200 µl de PBST e foram adicionados os scFvs em uma diluição seriada começando em 243 µg/ml até 0 µg/ml. Da mesma maneira foi adicionado um scFv contra um antígeno não relacionado como controle negativo. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C novamente.

A placa foi lavada novamente nas mesmas condições que anteriormente, e foi adicionado o Anti-His (Invitrogen, cat: A5588) na diluição de 1:2000 em TBST. Foram adicionados 100 µl do Anti-His em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada novamente nas mesmas condições.

Momentos antes da revelação, foi preparada a solução de revelação contendo o PNPP diluído em APB em uma concentração de 5 mg/mL. Foi adicionado 100 µL em cada poço e aguardamos 5 minutos para realizar a leitura da placa a 405 nm. Os dados obtidos foram utilizados para plotagem de gráficos no programa Graphpad.

4.13.3.ELISA Contra a Partícula viral do SARS-CoV-2

Para análise da ligação do scFvs a partícula viral do SARS-CoV-2 foi realizado o ensaio de ELISA indireto, usando uma amostra inativada do vírus gentilmente cedida pelo Dr.

Pedro Viera (Unicampi). Uma placa de 96 poços (Coarning, Ref:3595) foi sensibilizada com 100 µl da solução contendo a partícula do vírus na diluição de 1-1000 , e em seguida a placa foi mantida a 4°C durante a noite e a 37°C por uma hora no dia seguinte. Foram realizadas lavagens com 200 µl de PBST por três vezes. Em seguida foi realizada a etapa de bloqueio com BSA 1% diluído em PBST que foi previamente filtrada com uma membrana de 0,22 µm. Foram adicionados 200 µl em cada poço da placa que foi incubada à 37°C por 1 hora.

Após o bloqueio a placa foi lavada novamente por 3 vezes com 200 µl de PBST e foram adicionados os scFvs em uma diluição seriada começando em 243 µg/ml até 0 µg/ml. Da mesma maneira foi adicionado um scFv contra um antígeno não relacionado como controle negativo. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C novamente.

A placa foi lavada novamente nas mesmas condições que anteriormente, e foi adicionado o Anti-His (Invitrogen, cat: A5588) na diluição de 1:2000 em TBST. Foram adicionados 100 µl do Anti-His em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada novamente nas mesmas condições.

Momentos antes da revelação, foi preparada a solução de revelação contendo o PNPP diluído em APB em uma concentração de 5 mg/mL. Foi adicionado 100 µL em cada poço e aguardamos 5 minutos para realizar a leitura da placa a 405 nm no espectrofotômetro SpectraMax M2e. Os dados obtidos foram utilizados para plotagem de gráficos, nos quais foi aplicado análise por regressão não linear no programa Graphpad.

4.14. Digestão dos scFv Acp com Sumo Protease

O fragmento de anticorpo Acp foi incubado com a Sumo protease em uma proporção de 40 µg para 5 µg respectivamente. A reação foi realizada no tampão da enzima 10x (500 mM Tris-HCl pH 8.0; 2% Igepal; 1.5 M NaCl) em um volume de reação de cerca de 1 mL. A reação foi realizada durante 16 horas, a 4° C.

4.15. purificação dos scFvs por exclusão molecular

Os fragmentos de anticorpo previamente purificados por afinidade ao níquel foram purificados também por exclusão molecular. Para a exclusão molecular foi utilizada a coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Ref: 17-5175-01). Essa coluna possui 24 mL e é adequada para purificações em pequena escala (µg-mg). Antes da purificação, a coluna foi lavada com 2 CV (volume de coluna) de água milliq filtrada com membrana de 0,22 µM. A

coluna foi equilibrada com 2,5 CV (volume de coluna) de tampão de fosfato (fosfato de sódio 0,2 M; pH6,8) que também foi utilizado para a etapa de eluição. A amostra contendo os anticorpos foi concentrada para o volume de 100 μ L. Após o equilíbrio da coluna iniciou-se a purificação com a aplicação da amostra. Para a eluição, foram utilizados 2,5 CV do tampão de fosfato e o fluxo utilizado foi de 1 mL por minuto. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas durante toda a eluição. A fração em que foi observado um pico de absorbância foi analisada em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.

5. RESULTADOS

5.1. Desenho do Peptídeo de Fusão mimético

Desde do início da pandemia, a Proteína S do SARS-CoV-2 tem sido o principal alvo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, seja vacinas ou anticorpos monoclonais. O RBD foi o foco devido a sua importância para a entrada da partícula viral nas células, de maneira que a ligação do RBD ao ACE2 é uma etapa crucial no mecanismo de infecção. Entretanto, ao longo da pandemia várias mutações foram surgindo e no primeiro ano da pandemia já havia variantes do SARS-CoV-2 em circulação. Essas variantes acumularam mutações e muitas delas no RBD, sendo que a variante Omicron acumulou 15 mutações somente no RBD.

Além do SARS-CoV-2, outros dois coronavírus foram capazes de saltar a barreira entre espécies e infectar humanos, o SARS-CoV e o MERS-CoV. Há também 7 coronavírus que já infectaram humanos, como por exemplo o Alfa Coronavirus NL63, Alfa coronavírus 229E e o Beta Coronavirus OC43. Apesar da diferença genética entre os coronavírus, todos apresentam similaridade com o SARS-CoV-2 na região da Proteína S na região do FP (Figura 16).

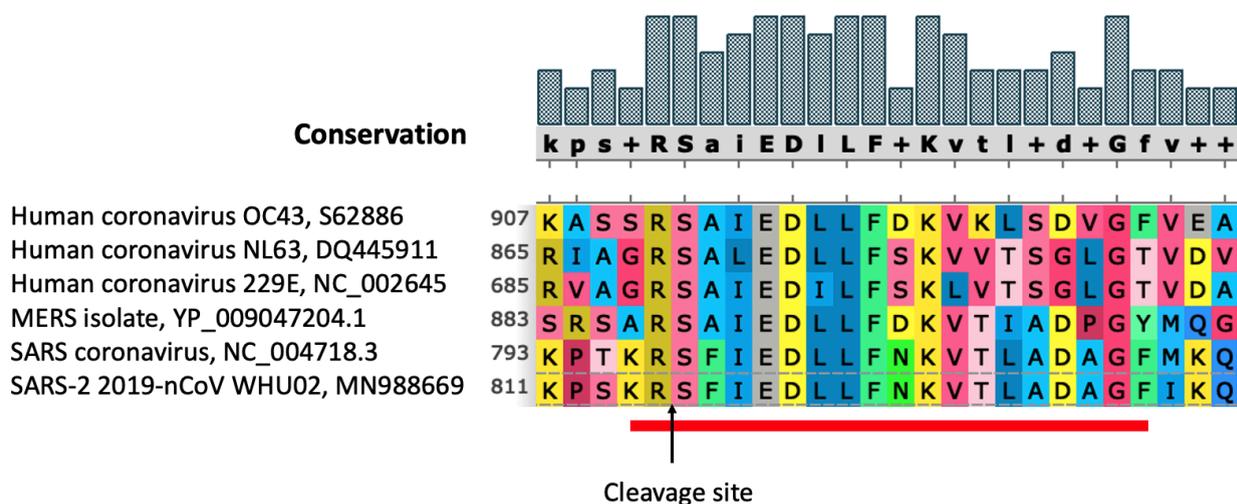


Figura 16. Alinhamento da região do Sítio de Clivagem S2' em diferentes coronavírus. Análise da identidade na sequência de aminoácidos dentro da Proteína S de diferentes coronavírus, destacando a conservação dos resíduos de Arginina(R) e Serina (S) no sítio de clivagem.

A região do FP juntamente com o sítio de clivagem S2' são importantes para a entrada do SARS-CoV-2 nas células. A clivagem deste sítio leva a mudanças conformacionais na

Subunidade S2 da Proteína S, o que empurra o FP em direção à membrana celular, culminando na fusão das membranas. Portanto, essa região do FP (Figura 17) pode ser um epítipo para anticorpos neutralizantes.

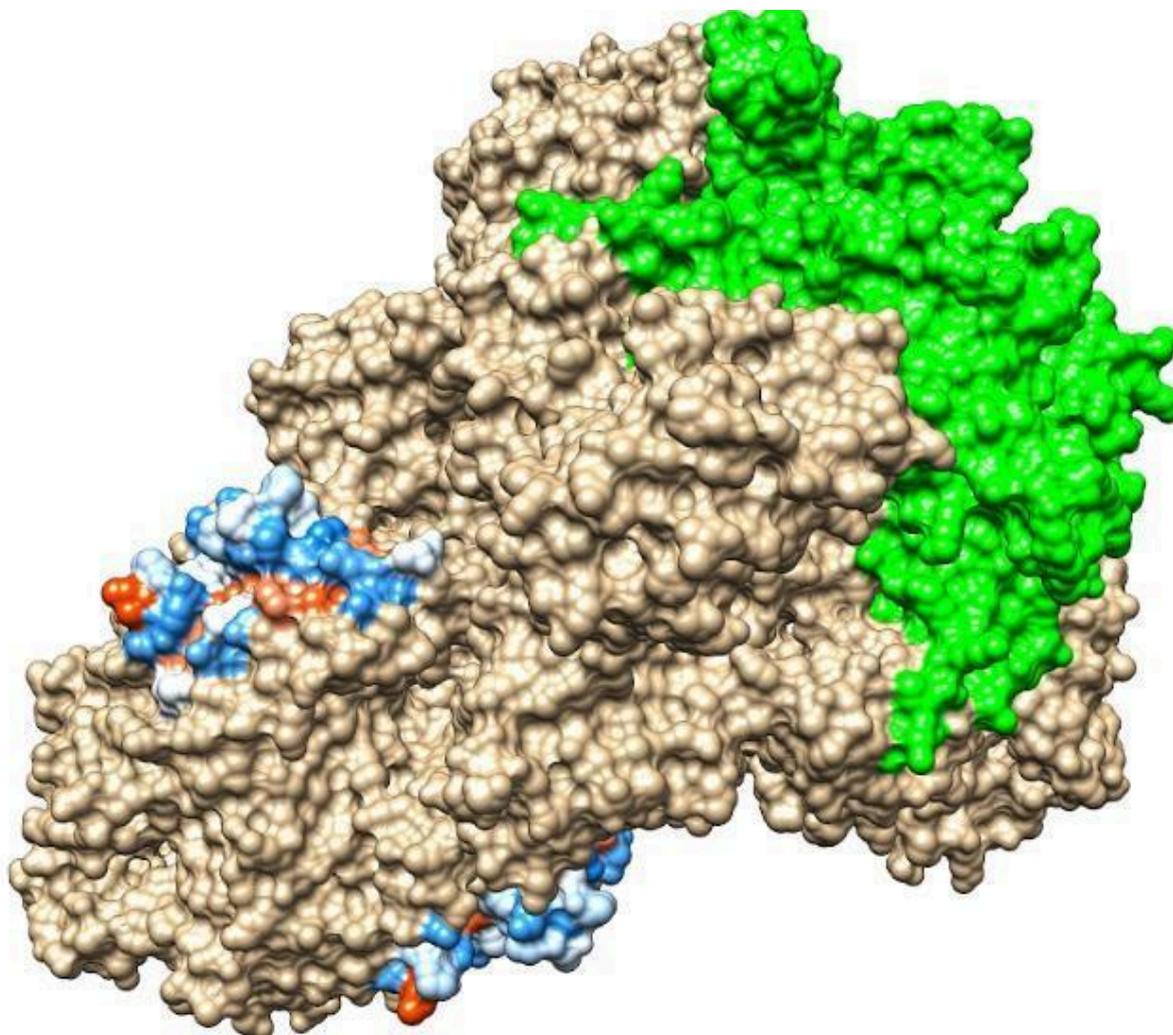


Figura 17. Estrutura tridimensional da Proteína S. Representação da estrutura tridimensional do trímero de Proteína S do Sars-CoV-2. Em verde é destacado o RBD. Em azul é destacada a região do Peptídeo de Fusão que está colorizada de acordo com a carga eletrostática (azul, positiva; vermelho, negativo; branco, neutro). As coordenadas são da estrutura do PDB 6vxx e renderizadas com o programa Chimera.

Analisando as sequência de aminoácidos que compõem a Proteína S observamos que a região próxima ao sítio de clivagem S2' é bem conservada mesmo entre as variantes do SARS-CoV-2. Essa região engloba o Peptídeo de Fusão que desempenha uma função importante para a entrada do vírus na célula. Mesmo na variante Omicron há apenas uma troca de aminoácidos na região próxima ao Peptídeo de Fusão (Figura 18).

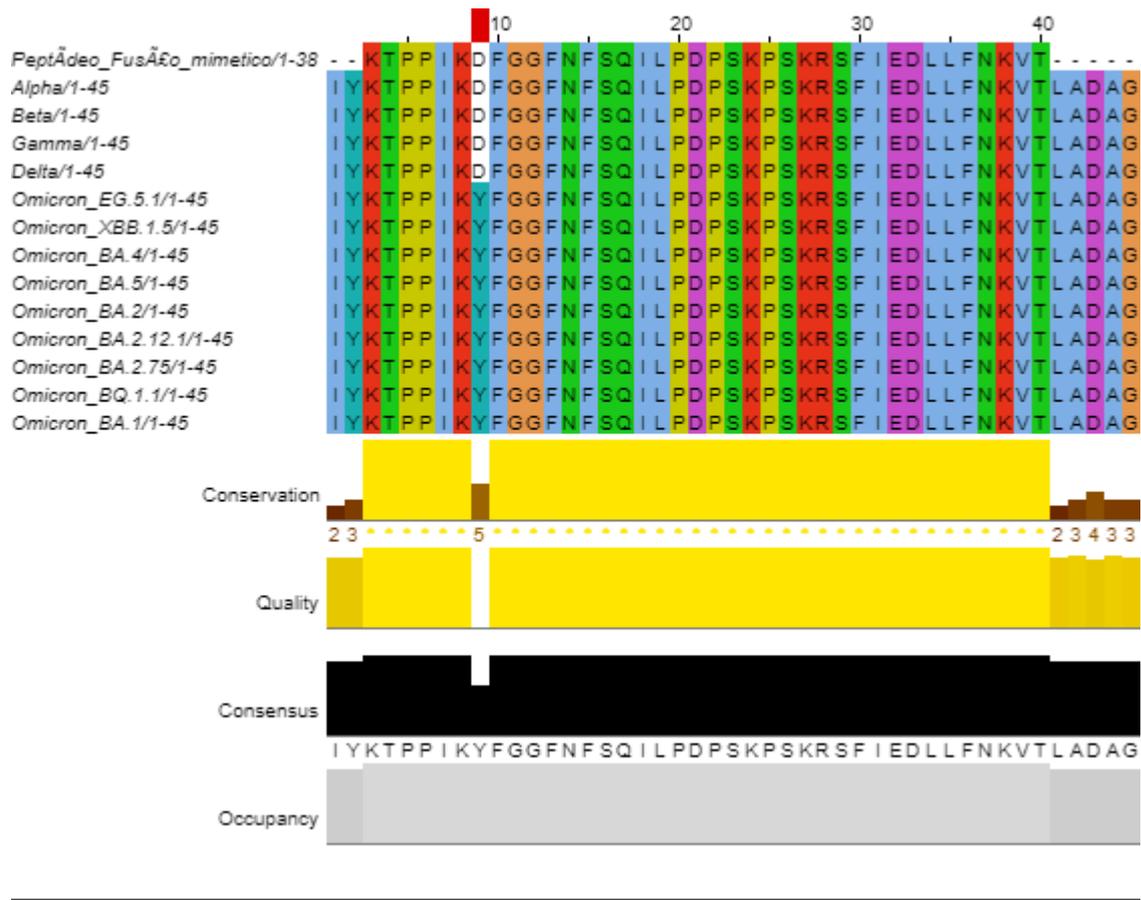


Figura 18. Alinhamento do peptídeo mimético com a região do Peptídeo de Fusão. Alinhamento da região do peptídeo de fusão de diversas variantes do SARS-CoV-2 e do Peptídeo de Fusão mimético que foi sintetizado. Alinhamento realizado no software CLUSTALW e visualizado no software Jalview.

Portanto, optamos por utilizar o FP como antígeno para a seleção de anticorpos com potencial neutralizante. Para isso, foi sintetizado um Peptídeo de Fusão mimético baseado na sequência do FP do SARS-CoV-2 original de Wuhan. Uma potencial ponte dissulfeto foi adicionada por meio da alteração dos os resíduos Ser798Cys e Leu768Cys (Figura 19). Essa alteração foi realizada para que o mimético de FP adotasse uma conformação circular durante a fase de síntese química.

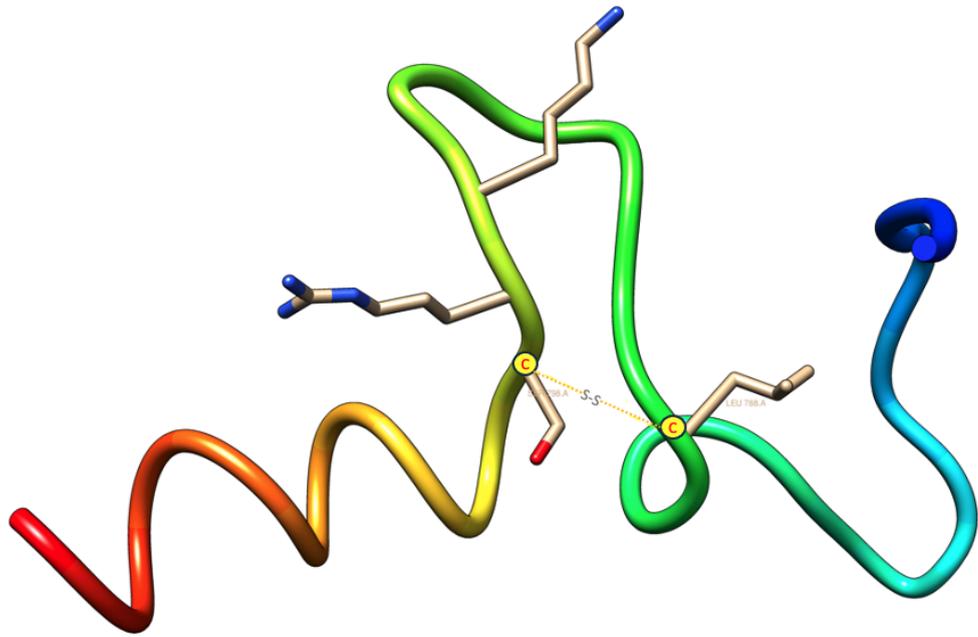


Figura 19. Estrutura tridimensional do Peptídeo de Fusão mimético. Representação do FP mimético que foi utilizado na seleção por Phage Display. Uma ponte dissulfeto foi adicionada para tornar o peptídeo circular alterando os resíduos Ser798Cys e Leu768Cys. As coordenadas espaciais foram retiradas da estrutura cristalográfica 6VXX.

Esse peptídeo foi sintetizado em duas versões, uma conjugada com a biotina e outra livre. Este peptídeo foi utilizado como antígeno para a seleção de anticorpos por meio da técnica de Phage Display.

5.2. Seleção dos anticorpos ligantes ao Peptídeo de Fusão

Para a seleção de anticorpos contra o Peptídeo de Fusão do SARS-CoV-2 foi utilizada uma biblioteca de Fab naïve. A biblioteca de anticorpos foi transformada em bactérias da linhagem XL1-BLUE MRF'. Após o procedimento de transformação, as bactérias foram infectadas com o fago helper, e assim foram produzidas partículas virais que expressavam em sua superfície uma molécula de anticorpo no formato Fab.

Para a seleção foi utilizada uma placa de ELISA previamente sensibilizada com estreptavidina seguida do Peptídeo de Fusão conjugado com a biotina. Os fagos com as moléculas

de anticorpo na superfície eram adicionados. Após as lavagens eram feitas duas eluições, uma com solução ácida e outra por competição utilizando o Peptídeo de Fusão livre de biotina. Os fagos eluídos foram reamplificados por infecção de bactérias da linhagem XL1-BLUE MRF', e re selecionados. Foram realizados 4 ciclos de seleção sendo que a cada ciclo aumentava-se o número de lavagens para aumentar a estringência da seleção.

Todo o processo de seleção foi acompanhado pela titulação dos fagos que entravam na seleção, o *input* e os fagos recuperados após a seleção, o *output* (Tabela 4). O *output* era reamplificado para cada ciclo de seleção. Na tabela 4 estão representados os dados da titulação para cada ciclo de seleção.

Tabela 4. Titulação dos fagos. O título de fagos presentes em cada ciclo de seleção para cada uma das seleções.

TITULAÇÃO DOS FAGOS

SELEÇÃO ÁCIDA

Round	Lavagem	Input	Output	Razão Input/Output
1	5x	$3,9 \times 10^{12}$	$6,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^7$
2	10x	$1,4 \times 10^{12}$	$6,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^8$
3	15x	$1,1 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^4$	$8,5 \times 10^7$
4	15x	$2,6 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^4$

SELEÇÃO COMPETIÇÃO

Round	Lavagem	Input	Output	Razão Input/Output
1	5x	$3,9 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^7$
2	10x	$2,8 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^7$
3	15x	$5,4 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^7$
4	15x	$2,5 \times 10^{11}$	$6,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^6$

Na tabela 4 observa-se que a razão *input/output* apresenta uma queda no número de fagos a cada ciclo de seleção. A razão *input/output* mostra o número de fagos que estão sendo perdidos a cada ciclo de seleção, demonstrando que realmente está ocorrendo um processo de seleção.

5.3. Amplificação dos Domínios variáveis

Os VHs e VLs presentes na biblioteca antes da seleção e no 4 ciclo de seleção foram amplificados por meio de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Figura 20). Para o VH e VL obtivemos uma banda de amplificação com cerca de 400 pb, o que condiz com o tamanho esperado para o domínio variável com o oligonucleotídeo iniciador.

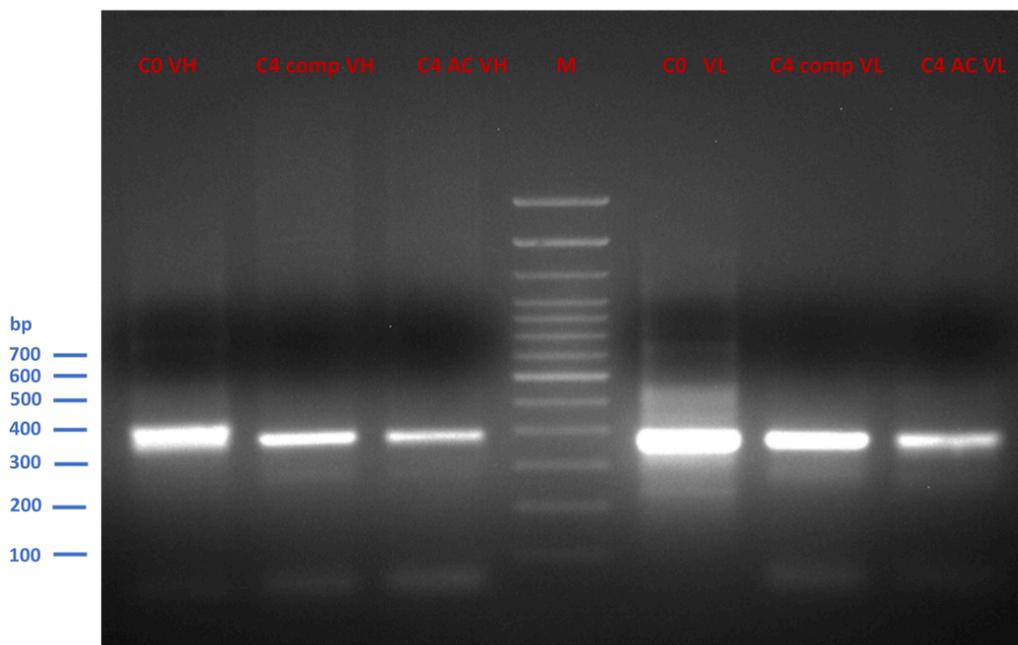


Figura 20. Amplificação dos domínios variáveis VH e VL. Análise por eletroforese em gel de agarose (2,0%) da amplificação por PCR dos genes dos domínios variáveis VH e VL dos anticorpos da biblioteca antes da seleção (C0: VH e VL) e dos anticorpos selecionados na seleção por competição (C4 Comp) e na seleção ácida (C4 AC). M: Marcador de peso molecular 100 bp plus DNA ladder (Invitrogen, cat: 15628-019).

5.4. Sequenciamento dos domínios variáveis

As bandas amplificadas correspondentes ao VH e VL foram extraídas do gel de agarose e purificadas. O material resultante foi submetido ao sequenciamento de nova geração na plataforma Illumina para obtermos as sequências de anticorpos presentes na biblioteca antes da seleção e após o 4º ciclo de seleção. Através do sequenciamento esperávamos conhecer as sequências de anticorpos que foram mais enriquecidas durante a seleção.

Os dados obtidos no sequenciamento foram analisados na ferramenta de bioinformática desenvolvida pelo nosso grupo denominada ATTILA (MARANHÃO, *et al.*, 2020). O ATTILA é

capaz de determinar quais VHs e VLs foram enriquecidos durante o processo de seleção por meio da comparação das sequências de VH e VL presentes na biblioteca antes da seleção, o ciclo 0, e no ciclo 4. E dessa forma o ATTILA gera um relatório com as sequências mais enriquecidas durante a seleção pelo Phage Display. Através dessa análise no ATTILA observamos uma redução da diversidade de clones quando comparamos a diversidade da biblioteca antes da seleção e do 4º ciclo de seleção (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do sequenciamento Illumina no ATTILA. Resultados do sequenciamento após análise *in silico* das sequências lidas. Os números de sequências apresentadas correspondem a sequências peptídicas dos domínios variáveis encontradas em cada ciclo da seleção por competição e da seleção ácida. A razão corresponde ao percentual de sequências que são únicas no conjunto total de sequências em cada população.

População de clones	Número total de sequências	Número de sequências únicas	Percentual de sequências únicas em relação ao total
Ciclo 0 VH	319932	182369	57%
Ciclo 4 Competição VH	369881	22893	6,2%
Ciclo 4 ácido VH	376384	10795	2,9%
Ciclo 0 VL	378368	107736	28,5%
Ciclo 4 Competição VL	387975	20703	5,3%
Ciclo 4 ácido VL	209031	5852	2,8%

Os VHs e VLs mais enriquecidos foram combinados para gerar 2 anticorpos. Devido a limitação do sequenciamento na plataforma Illumina, que consegue ler com qualidade cerca de 300 pb, acabamos por perder os pares de VH e VL originalmente selecionados. Para contornar essa situação, combinamos aleatoriamente os melhores VHs e VLs. Nessa seleção, o mesmo VH foi enriquecido na seleção ácida e por competição e dois VLs distintos foram selecionados em cada uma das seleções. O VH pertencente a Família IGHV4-34*01 ou VH4-34, com identidade germinal de 99,0% foi o mais enriquecido em ambas as seleções. Já o VL pertencente a família

IGVK4-1*01, com identidade germinal de 97,0% foi o mais enriquecido na seleção por competição. Para a seleção ácida o VL mais enriquecido foi o pertencente a família IGVK1-33*01 com Identidade germinal de 85,3%.

Dois anticorpos no formato scFv foram desenhados, um com o VL da seleção por competição, que foi chamado de Acp, e outro com o VL da seleção ácida que foi denominado Aca. O VH em ambos os casos foi o mesmo obtido nas duas seleções. O desenho foi feito baseado no formato de scFv com códons otimizados para expressão em *E. coli*.

5.5. Caracterização dos scFvs

5.5.1. Expressão na linhagem *Shuffle pLys Y*

As sequências dos scFvs Aca e Acp clonadas no vetor pET-Sumo foram utilizadas para expressão dos mesmos em *E.coli* da linhagem *Shuffle pLys Y*. Esta linhagem possui um citoplasma oxidante que favorece a formação de pontes dissulfeto que são essenciais para estabilização de moléculas de anticorpos, além de possuir uma chaperona da qual foi retirado o peptídeo sinal de endereçamento ao periplasma, fazendo que a chaperona fique retida no citoplasma.

A linhagem *Shuffle pLys Y* pertence a linhagem DE3, tendo portanto em seu genoma uma RNA polimerase viral codificada pelo gene I do bacteriófago T7, que é capaz de se ligar ao promotor T7 que está presente nos vetores de expressão pET. O Plasmídeo *pLys Y* que carrega o gene da lisozima T7 – que codifica uma proteína bifuncional, inibidora da T7 pol e uma atividade enzimática do tipo lisozima – foi modificado para manter apenas sua função regulatória da expressão de genes sob o controle do promotor T7. Nos vetores pET, o promotor T7 está sob o controle do operon lac e a expressão pode ser induzida por meio da adição da lactose ou do seu análogo IPTG (Figura 21A).

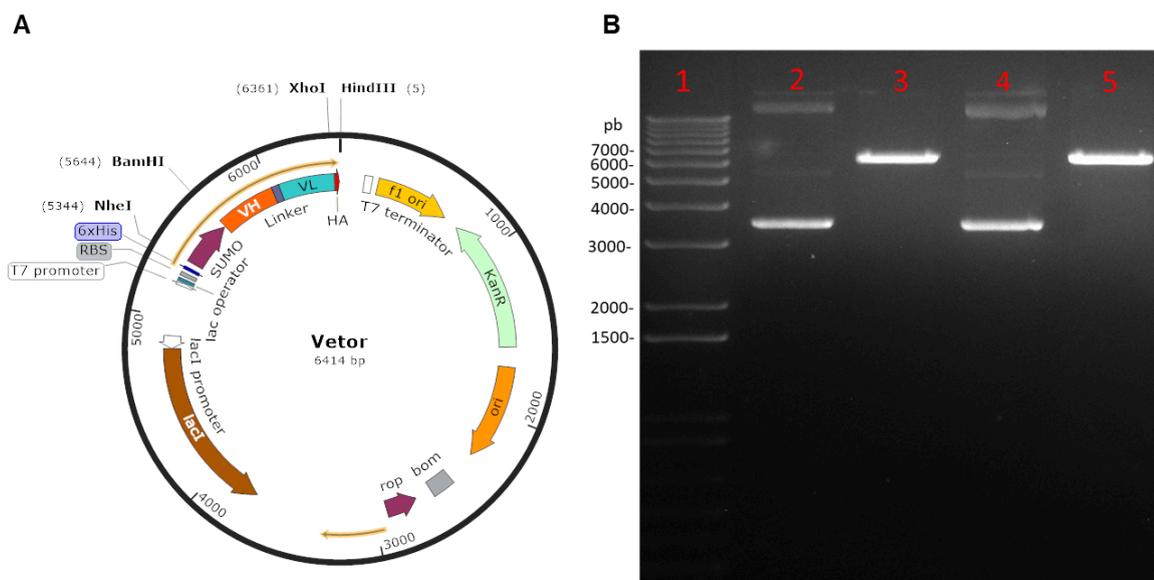


Figura 21. (A) Mapa do vetor de expressão pET-SUMO contendo os genes dos anticorpos scFv Acp e Aca. VH e VL - domínios variáveis de cadeia pesada e leve de anticorpo, respectivamente; Linker – conector peptídico; promotor T7 - promotor do fago T7; Operador Lac – Local de ligação do repressor do operon Lac; 6xHIS – sequência de seis resíduos de Histidina; HA – Cauda da proteína hemaglutinina do vírus Influenza A; SUMO – proteína SMT3 da família SUMO de *Saccharomyces cerevisiae*; RBS – sítio de ligação do ribossomo. **(B) Análise da clonagem de genes de anticorpos recombinantes para o vetor de expressão pet-sumo.** A clonagem foi confirmada pela análise em gel de agarose do vetor linearizado com a enzima de restrição Bam-HI. 1. Marcador de peso molecular de 1 Kb (cat: 10488085); 2. vetor ACp-pET-SUMO intacto; 3. Vetor ACp-pET-SUMO linearizado; 4. Vetor Aca-pET-SUMO intacto; 5. Vetor Aca-pET-SUMO linearizado.

A condição de expressão 4, foi a adotada para os experimentos de expressão. nessa condição, a expressão foi realizada em 200 mL de meio TB contendo glicose na concentração final de 1% até que a cultura atingisse a D.O de 2,0 e em seguida a expressão era induzida com a adição de IPTG na concentração de 1 mM, e a cultura era mantida sob agitação de 200 RPM por 4 horas a 20°C (Figura 22).

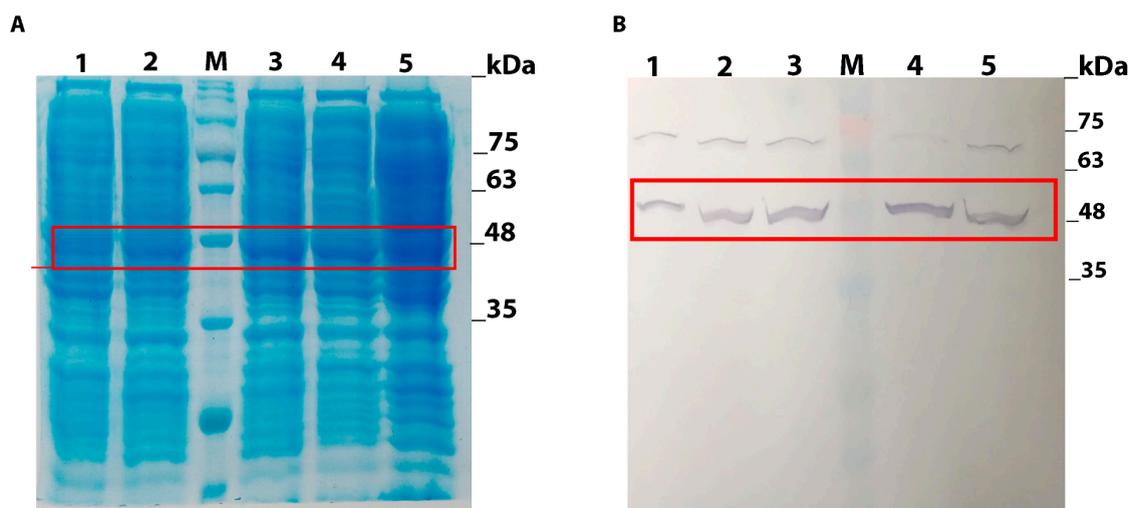


Figura 22. (a) SDS-Page da padronização da expressão do scFv Aca na linhagem *Shuffle pLys Y.1-5*. Condições 1-5; M Blueeye prestained protein ladder (Lot 94964). (b) Western blot da padronização da expressão do scFv Aca na linhagem *Shuffle pLys Y*. Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-His seguido de anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. Condições 1-5; M Blueeye prestained protein ladder (Lot 94964).

Purificação por Cromatografia de afinidade ao níquel

Com a padronização da expressão finalizada, partimos para a purificação dos scFvs Aca e Acp. Ressaltamos que ambas as construções foram clonadas no vetor pET-SUMO, de maneira que na extremidade amino-terminal havia a sequência His tag (Uma sequência de 6 histidinas) e na extremidade carboxi-terminal havia a sequência HA tag (Hemaglutinina). Para purificação exploramos a His tag, pois realizamos a purificação por meio de cromatografia de afinidade ao níquel no sistema *Akta pure*, na qual utilizamos colunas Hisrap. Essas colunas são constituídas de íons imobilizados de níquel e ao passarmos nossa amostra pela coluna os fragmentos de anticorpo ficaram retidos na coluna pela His tag.

Antes de cada purificação, a coluna Hisrap era previamente equilibrada com tampão de ligação. Após a aplicação da amostra, a coluna era lavada com 30 mL de tampão com 10 mM de imidazol e com 20 ml de tampão com 50 mM de imidazol (Figura 23). Vale destacar que para o scFv Acp as lavagens eram feitas com 50mM e 100mM de imidazol respectivamente (Figura 27). Essas pequenas diferenças no protocolo de purificação foram estabelecidas devido a diferenças observadas nas frações de eluição dos dois anticorpos, pois com a lavagem com 100 mM de imidazol obtivemos um melhor grau de pureza do Acp enquanto que com 100 mM de imidazol o Aca já se desprendia da coluna Hisrap. Para eluição, utilizamos o gradiente em degraus da

concentração do imidazol começando com 100 mM até 500 mM para o Aca e começando com 300 mM e indo até 500 mM para o Acp.

O cromatograma da purificação por meio de afinidade ao níquel para o anticorpo Aca é mostrado abaixo (Figura 23). Observando a curva da UV vemos que a aplicação do lisado celular eleva a absorbância até 2600 mAU e no momento da lavagem a absorbância decai até um valor próximo de zero. Na etapa de eluição não é esperado que haja picos de absorbância devido ao agente utilizado, o imidazol, que absorve UV, mascarando a absorbância.

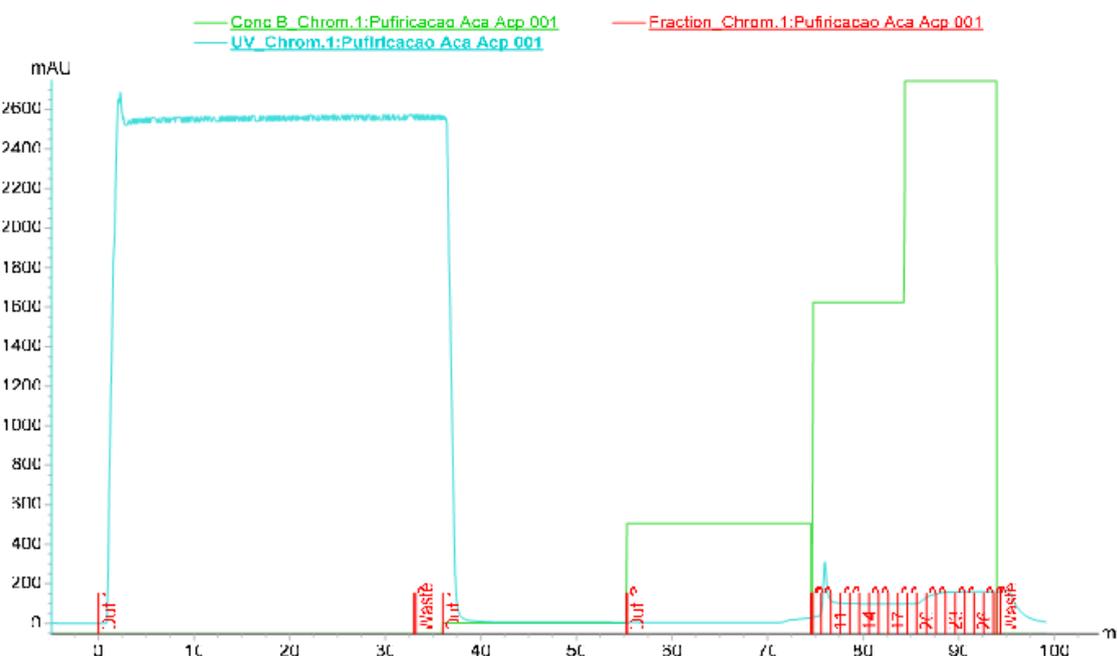


Figura 23. Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel do Anticorpo Aca no Akta Pure. O extrato celular contendo o anticorpo Aca em um volume de 40 mL foi aplicado na coluna Histrap HP. A eluição foi feita com tampão de fosfato contendo de 100 mM a 500 mM de imidazol.

A purificação do Aca foi analisada por meio de *SDS-Page* e *Western-blot* (Figura 24 e 25). Nas frações de eluição no *SDS-Page* podemos observar algumas bandas fracas acima da banda correspondente a banda do scFv e bandas difusas abaixo dele.

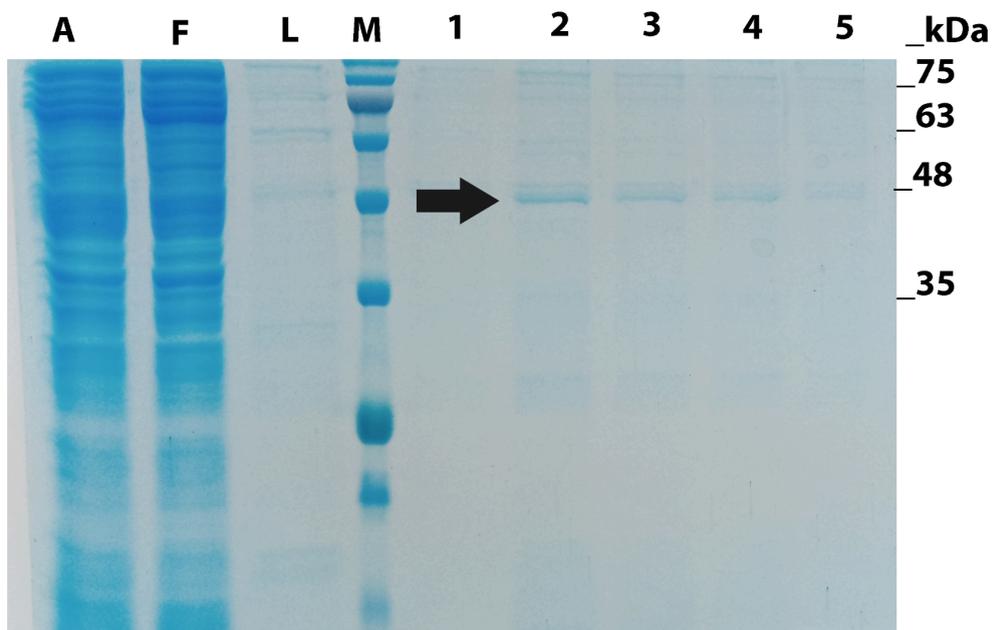


Figura 24. SDS-Page da Purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA. A. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5. frações eluídas com 100-500mM de Tampão de imidazol.

As bandas que aparecem na Figura 24 podem ser agregação do scFv e também aparecem no *Western-blot* no qual foi utilizado um anticorpo anti-HA (figura 25). Apenas uma das bandas abaixo do scFv aparece no *Western-blot*. Após a purificação as frações eluídas foram concentradas e dessalinizadas e posteriormente quantificadas pelo método de Bradford.

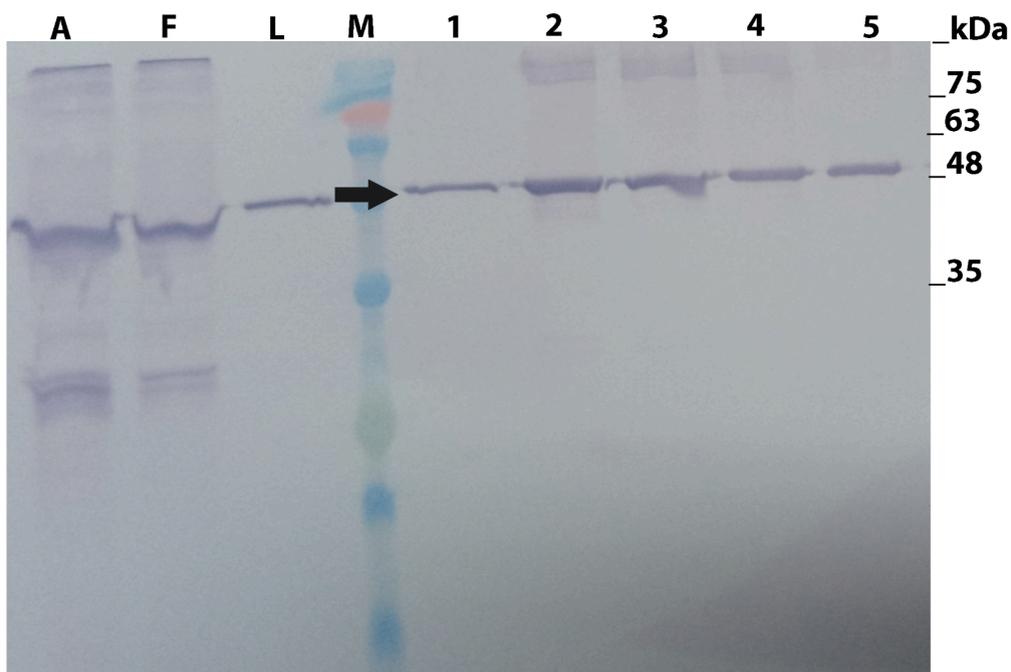


Figura 25. Western blot da purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-HA. Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-HA e anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. A. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueeye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5. frações eluídas com 100-500mM de Tampão de imidazol.

Foi realizado um *Western blot* utilizando o anticorpo anti-His (Figura 26). Observamos novamente as bandas acima da banda correspondente ao scFv, e também podemos visualizar uma banda abaixo que provavelmente representa uma leve degradação do scFv.

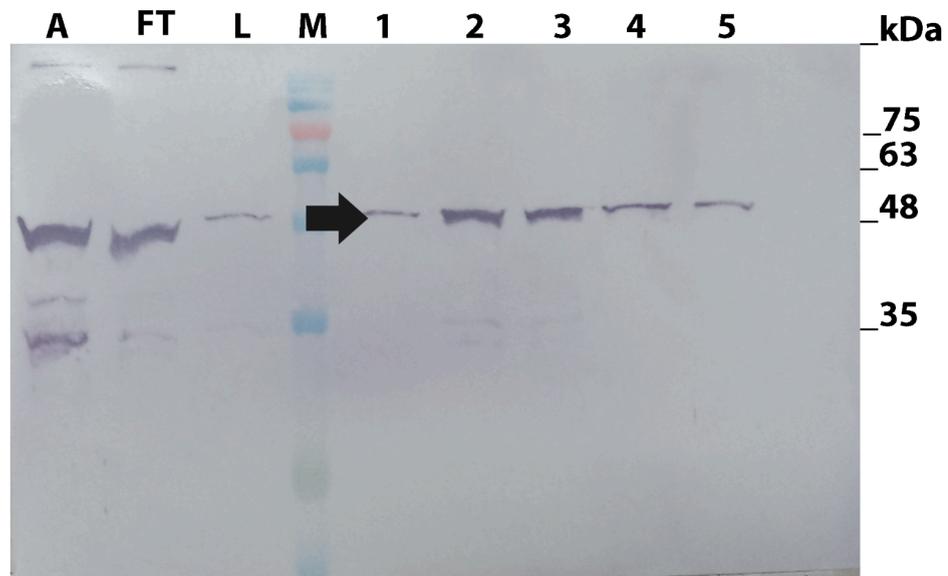


Figura 26. Western blot da purificação do Anticorpo Aca no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-his. Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-his conjugado a fosfatase alcalina A. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5. frações eluídas com 100-500mM de Tampão de imidazol.

O fragmento de anticorpo Acp foi purificado por afinidade ao níquel. Obtivemos um cromatograma bem similar ao cromatograma obtido para o Aca. Durante a aplicação da amostra a absorbância atingiu cerca de 2600 mA e durante a lavagem este valor chegou muito próximo de 0. Durante a etapa de eluição houve um pequeno aumento da absorbância, principalmente na etapa na qual foi utilizado 500 mM de imidazol.

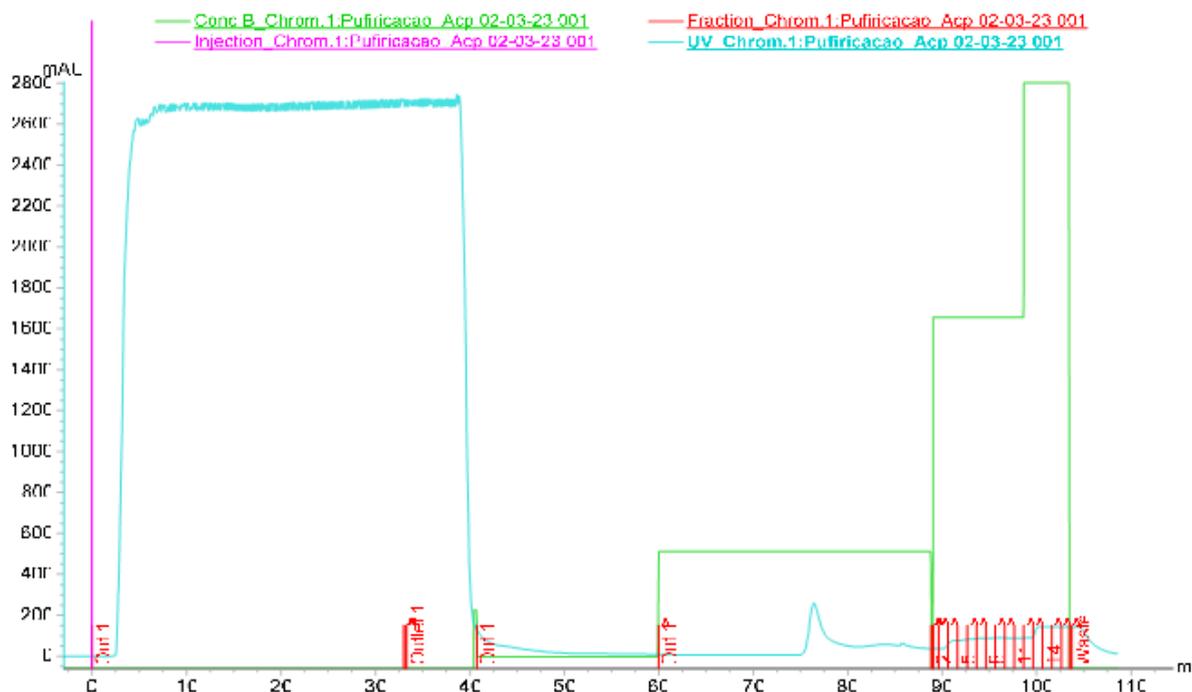


Figura 27. Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel do Anticorpo Acp no Akta Pure. O extrato celular contendo o anticorpo Acp em um volume de 40 mL foi aplicado na coluna HisTrap HP. A eluição foi feita com tampão fosfato contendo de 300 mM a 500 mM de imidazol.

Analizamos a purificação do Acp por meio de *SDS-Page* (Figura 28). Amostras referentes a eluição com 300 mM e 500 mM foram analisadas no gel. O Acp tem um peso molecular de cerca de 41 kDa. No gel visualizamos algumas bandas fracas acima da banda correspondente ao scFv e outras bandas fracas abaixo do scFv, que provavelmente são degradações do mesmo.

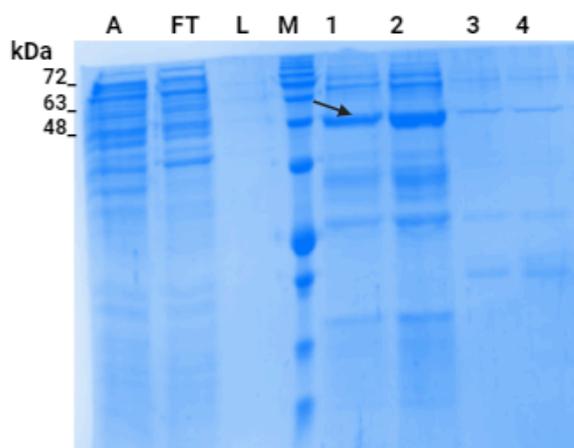


Figura 28. SDS-Page da Purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA. A.Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueeye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5.frações eluidas com 300-500mM de Tampão de imidazol.

Amostras da purificação do Acp também foram analisadas por *Western-Blot*. Na imunodeteccção com o anticorpo anti-his observamos nas frações eluidas a banda correspondente ao Acp (Figura 29).

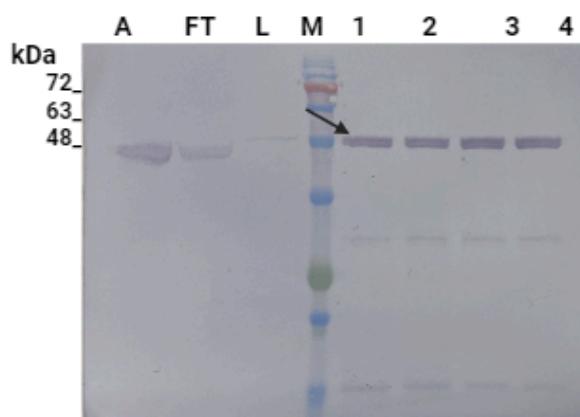


Figura 29. Western blot da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA, detecção com Anti-his. Imunodeteccção realizada com anticorpos Anti-his conjugado a fosfatase

alcalina. A. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5.frações eluidas com 300-500mM de Tampão de imidazol.

Havia duas bandas de baixa intensidade abaixo da banda do Acp que aparentavam ser degradações do mesmo. Entretanto, observamos que a maior parte do material estava no tamanho esperado. Realizamos também o *Western-Blot* com anti-HA (Figura 30).

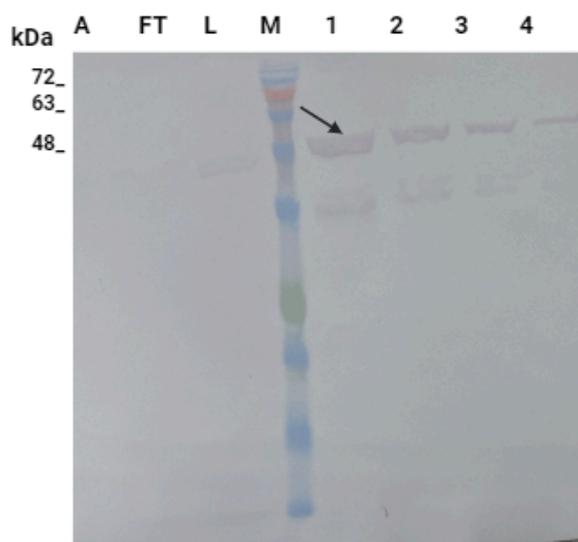


Figura 30. Western blot da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA detecção com Anti-ha.Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-Ha conjugado a fosfatase alcalina. A. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5.frações eluidas com 300-500mM de Tampão de imidazol.

Na imunodeteção com o anti-His foi visualizada novamente a banda correspondente ao anticorpo Acp. Assim, obtivemos ambos os fragmentos, Aca e Acp em quantidade suficiente para a caracterização por ELISA. Foi feita a média do rendimento de 3 experimentos de produção.

Tabela 6: Quantificação da expressão dos scFvs. Quantificação da quantidade de cada scFv expresso em *Shuffle p lys Y* por meio da técnica de Bradford.

scFv	Quantidade (mg/L)	Rendimento total
Aca	2,2 mg/L	450 µg
Acp	2,8 mg/L	500 µg

5.5.2. Ligação dos scFvs ao peptídeo mimético do Sars-CoV-2

Os fragmentos de anticorpos Aca e Acp foram testados no que diz respeito à capacidade de ligação ao Peptídeo de Fusão mimético do SARS-coV-2 por meio de ensaio de ELISA. Foi realizado o tipo de ELISA indireto, no qual uma placa de 96 poços foi previamente sensibilizada com 20 μg do Peptídeo de fusão Mimético. Tanto o Aca e Acp foram capazes de se ligar ao antígeno. Um scFv contra um antígeno não relacionado foi utilizado como controle negativo (Figura 31).

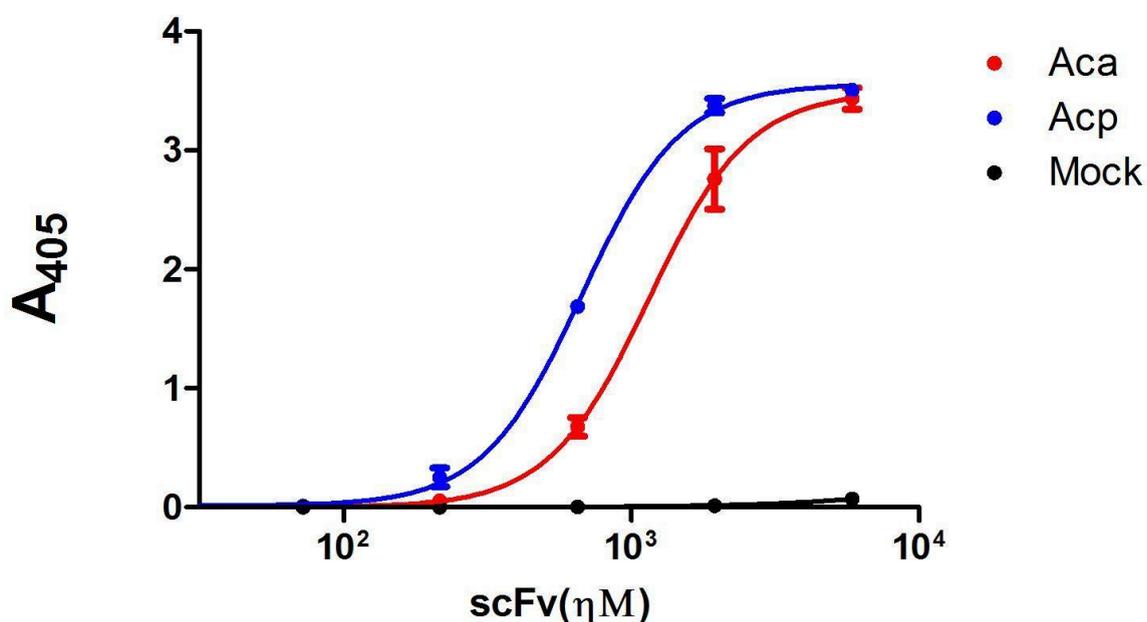


Figura 31. Ligação dos fragmentos de anticorpos ao Peptídeo Mimético. Avaliação por Elisa da ligação dos scFvs ao Peptídeo de fusão mimético. A placa Elisa foi sensibilizada com 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do Peptídeo de Fusão seguido da adição dos scFvs em diluição serial a partir de 5,95 μM . Um anticorpo não relacionado foi usado como controle negativo.

O anticorpo Acp demonstrou maior afinidade ao antígeno do que o Aca. O valor de EC50 (half-maximal effective concentrations) para o Aca foi de 1.149 ηM , enquanto que para o Acp foi de 672 ηM .

5.5.3. Ligação dos scFvs a Proteína S do SARS-coV-2

Os scFvs foram testados também para com sua ligação a proteína S das variantes Gama e Delta. Tanto o fragmento Acp quanto o Aca se ligam às Proteínas S na versão Gama e Delta. Mais uma vez o fragmento Acp demonstrou capacidade de ligação melhor que o fragmento Aca, para as duas variantes testadas, corroborando os dados do ELISA contra o peptídeo de fusão (Figura 32 e 33). A ligação a proteína S da variante Gama, o Aca apresentou um EC50 de 5.316 η M e o Acp 424 η M (Figura 32) . Destacamos que a variante Gama foi isolada no Brasil, em Manaus, ainda no ano de 2020.

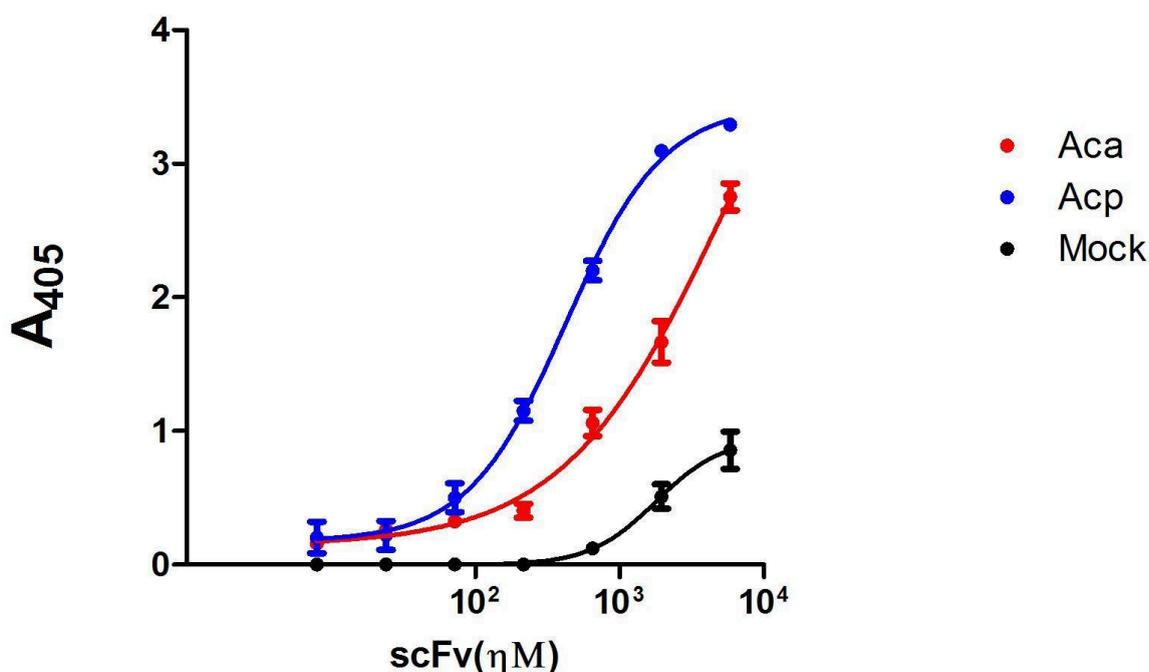


Figura 32. Ligação dos fragmentos de anticorpos à Proteína S da variante Gama. Avaliação por Elisa da ligação dos scFvs a Proteína S. A placa Elisa foi sensibilizada com 4 μ g/ml da Proteína S, seguido da adição dos scFvs em diluição serial a partir de 5,95 μ M. Um anticorpo não relacionado foi usado como controle negativo.

O valor de EC50 para o Aca foi de 2.351 η M para a variante Delta e de 798 η M para o Acp (Figura 33). Interessantemente, o valor de EC50 dos anticorpos contra as proteínas S, tanto quanto para variante Gama e Delta, foram maiores que os valores encontrados para o FP,

mostrando uma redução na capacidade desses anticorpos em reconhecer o peptídeo de fusão no contexto da proteína S inteira.

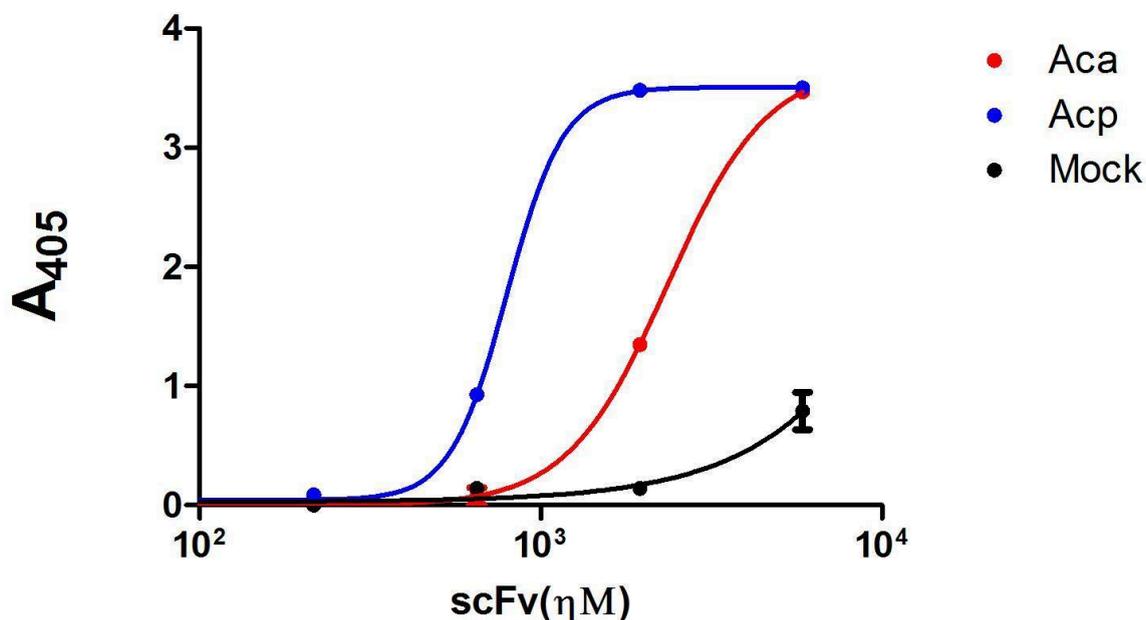


Figura 33. Ligação dos fragmentos de anticorpos à Proteína S da variante Delta. Avaliação por Elisa da ligação dos scFvs a Proteína S. A placa Elisa foi sensibilizada com 4 μ g/ml da Proteína S, seguido da adição dos scFvs em diluição serial a partir de 5,95 μ M. Um anticorpo não relacionado foi usado como controle negativo.

5.5.4. Ligação dos scFvs a partícula viral do SARS-coV-2 inativada

Foi testada a ligação dos scFvs a partícula viral do SARS-coV-2 inativada (variante de Wuhan), com o intuito de verificar se estes fragmentos poderiam reconhecer o Peptídeo de Fusão na conformação nativa, no contexto da Proteína S inteira na superfície da partícula viral (Figura 34). Novamente, os dois fragmentos foram capazes de se ligar à partícula viral, sendo que o Acp teve a melhor capacidade de ligação. Os valores de EC50 para o Aca e Acp foram respectivamente 1.658 η M e 557 η M.

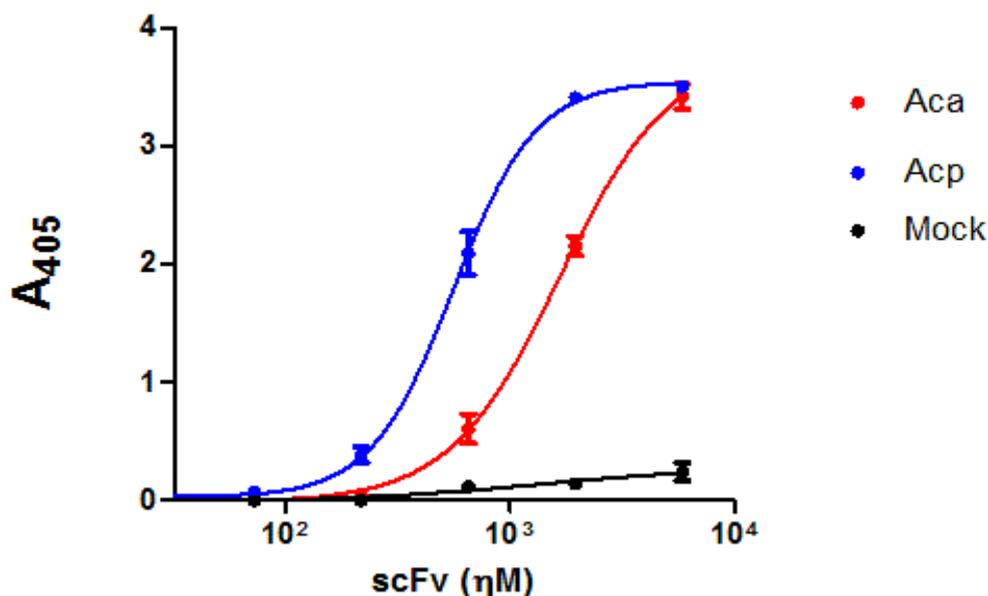


Figura 34. Ligação dos scFvs Aca e Acp ao vírus SARS-CoV-2 inativado (vírus de Wuhan). Avaliação da ligação dos scFvs ao vírus em uma placa de Elisa. A placa de Elisa foi sensibilizada com o vírus inativado em uma diluição de 1:1000. Os anticorpos foram adicionados em uma diluição seriada realizada a partir de 5,95 μM . Como controle negativo, foi utilizado um scFv específico para antígeno não relacionado, produzido no vetor de expressão pET-SUMO em células *Shuffle pLysY* e purificado sob as mesmas condições de purificação que os scFvs Aca e Acp.

Dados da literatura indicam que anticorpos contra o Peptídeo de Fusão não se ligam tão bem à Proteína S no estado anterior à ligação ao ACE2, mas sim na Proteína S após a ligação ao receptor celular. Portanto, há a possibilidade de que nossos fragmentos se liguem melhor na Proteína S após a ligação ao ACE2.

5.6. Remoção da SUMO do scFv Acp

Para testar a possibilidade de que a companheiro de fusão SUMO estaria interferindo com a ligação ao epítopo, e para possibilitar a realização da cristalografia do fragmento de anticorpo Acp, já que esse se mostrou mais promissor em todos os ensaios de ELISA, buscamos remover a Sumo fusionado ao amino-terminal do scFv. Acreditávamos que pelo fato de a SUMO ser um agente solubilizante ela atrapalharia na formação dos cristais do fragmento de anticorpo e também no momento da resolução da estrutura cristalográfica.

Então para remoção da SUMO do scFv expressamos uma SUMO protease heterologamente. O gene da Ulp-1 de *Saccharomyces cerevisiae* foi clonado no vetor de

expressão pET e expresso na linhagem *Shuffle pLys Y* nas mesmas condições que os scFvs Aca e Acp (Figura 35).

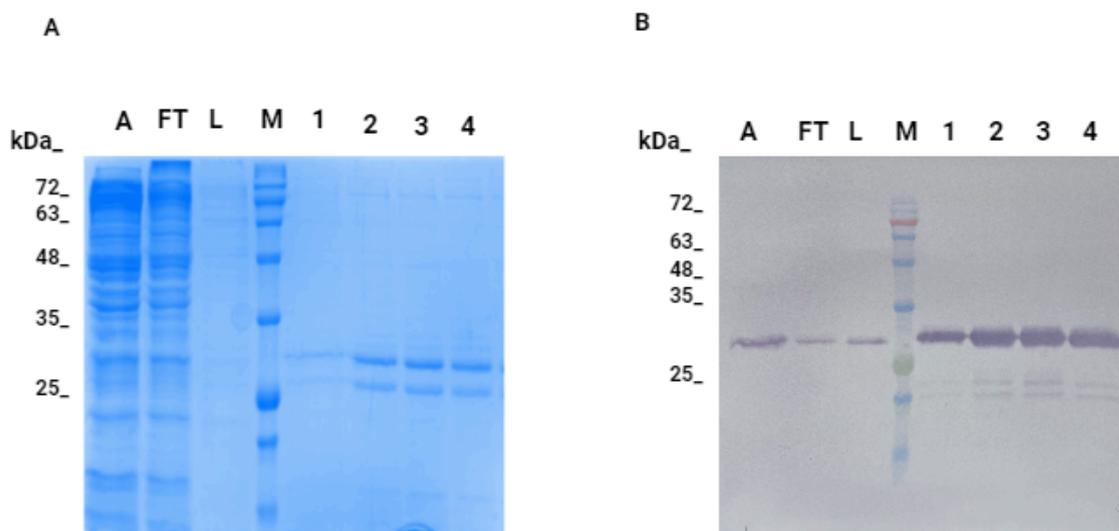


Figura 35. SDS-Page e Western blot da da purificação da SUMO protease no AKTA Pure utilizando coluna de Ni-NTA. A SDS-Page. Fração antes da purificação; FT. *Flow-through*; L. Lavagem; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-5. frações eluidas com 100-500 mM de Tampão de imidazol. B. Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-His e anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina.

A digestão com a SUMO protease foi testada com diferentes concentrações da enzima e do anticorpo Acp. A concentração de 5 μ g de SUMO protease para cada 40 μ g de anticorpo foi a escolhida (figura 36). No gel de SDS-Page podemos observar duas bandas no produto da digestão, uma correspondente ao anticorpo Acp digerido e outra correspondente a SUMO protease. O Acp sem a Sumo possui cerca de 27 kDa enquanto que a SUMO protease possui cerca de 30 kDa.

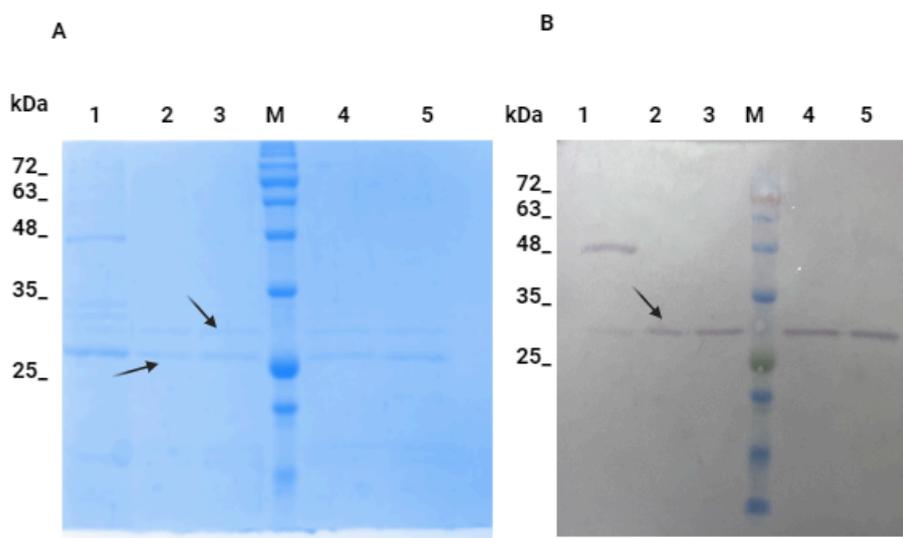


Figura 36. SDS-Page e Western blot da digestão do anticorpo Acp com a SUMO protease. A. SDS-Page. 1-Fração antes da digestão; 2- 10 ug do Acp digerido com 5ug de Sumo protease; 3-20 µg do Acp digerido com 5 µg de Sumo protease.; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964);4. 30 µg do Acp digerido com 5 µg de Sumo protease; 5.40 µg do Acp digerido com 5 µg de Sumo protease. As setas indicam o scFv digerido e a Sumo protease.B.Imunodeteccção realizada com anticorpos Anti-His e anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina.

No Western blot realizado com o Anti-His podemos visualizar apenas a SUMO protease pois o anticorpo digerido perde neste processo o His-tag (Figura 36 b). No vetor de expressão, o cassete de expressão é constituído pela His-tag que vem antes da Sumo seguida do VH, um linker conector, o VL e por fim a HA-tag. A Sumo possui cerca de 11 kDa mais cerca de 3 kDa da His-tag, então ao ser digerido o Acp que possui 41 kDa fica com 27 kDa.

Realizamos também a imunodeteccção com um anticorpo Anti-HA produzido em camundongo seguido de um anticorpo secundário contra IgG de camundongo produzido em coelho. O HA-tag é a outra tag disponível em nosso cassete de expressão. Nesse experimento esperávamos observar apenas o anticorpo digerido (Figura 37).

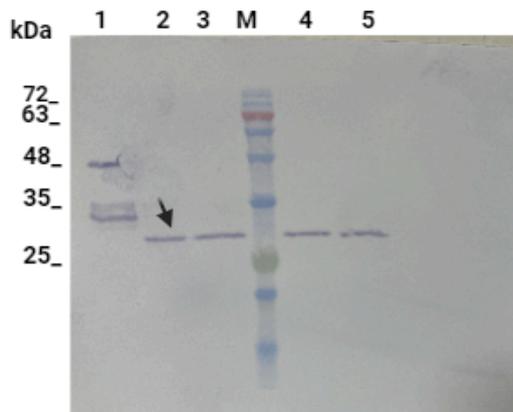


Figura 37. Western blot da digestão do anticorpo Acp com a SUMO protease. Imunodeteção realizada com anticorpos Anti-HA e anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. 1-Fração antes da digestão; 2- 10 μ g do Acp digerido com 5 μ g de Sumo protease; 3-20 μ g do Acp digerido com 5 μ g de Sumo protease.; M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964);4. 30 μ g do Acp digerido com 5 μ g de Sumo protease; 5.40 μ g do Acp digerido com 5 μ g de Sumo protease. A seta indica o scFv digerido.

Após a digestão com a Sumo protease, o scFv digerido foi novamente purificado por afinidade ao níquel no sistema Akta pure. Como o scFv perdeu a tag de histina juntamente com a Sumo, esperávamos que apenas esse fragmento ficasse preso na coluna enquanto que o anticorpo digerido deveria sair no *flow-through*. A sumo protease por ter uma tag de histina deveria também ficar retida na coluna. Portanto, nessa purificação esperávamos separar a Sumo protease, o fragmento da Sumo com a His-tag do resto do anticorpo digerido. Entretanto, o rendimento desse passo a passo de produção, purificação por afinidade ao níquel, digestão e purificação por afinidade ao níquel apresentou um rendimento baixo, e optamos por não mais remover a Sumo dos fragmentos de anticorpos.

5.7. Purificação por exclusão molecular

Após a caracterização dos anticorpos Aca e Acp esperávamos realizar a cristalografia do anticorpo Acp devido ao fato deste ser o mais promissor com relação a ligação ao antígeno. Por meio da determinação da estrutura cristalográfica do Acp e do Acp com o Peptídeo de Fusão esperamos conhecer em qual parte do Peptídeo de Fusão este anticorpo se liga e quais resíduos de aminoácidos interagem entre o anticorpo e o antígeno. Para esse objetivo, era necessário obter o scFv no maior grau de pureza possível. Por isso realizamos duas purificações, por afinidade ao níquel e por exclusão molecular.

No primeiro passo de purificação, o anticorpo foi previamente purificado por afinidade

ao níquel no sistema Akta pure. Em seguida realizamos a concentração do anticorpo até o volume de 100 μ l. Para a Exclusão molecular utilizamos a coluna Superdex 200 10/300 GL. O princípio da purificação por exclusão molecular é separar as moléculas pelo tamanho. Moléculas maiores não conseguem penetrar nos poros da resina da coluna e são eluídos mais rapidamente. Já as moléculas menores entram nos poros da resina e são eluídos mais lentamente.

No manual da coluna podemos ver algumas corridas padronizadas com diferentes proteínas com diferentes pesos moleculares. A ovalbumina que foi utilizada para uma corrida padrão possui 44 kDa. Então, de acordo com o manual da coluna, esperávamos que o anticorpo fosse eluído da coluna entre 15 e 17 mL pois a molécula do anticorpo possui cerca de 41 kDa (Figura 38).

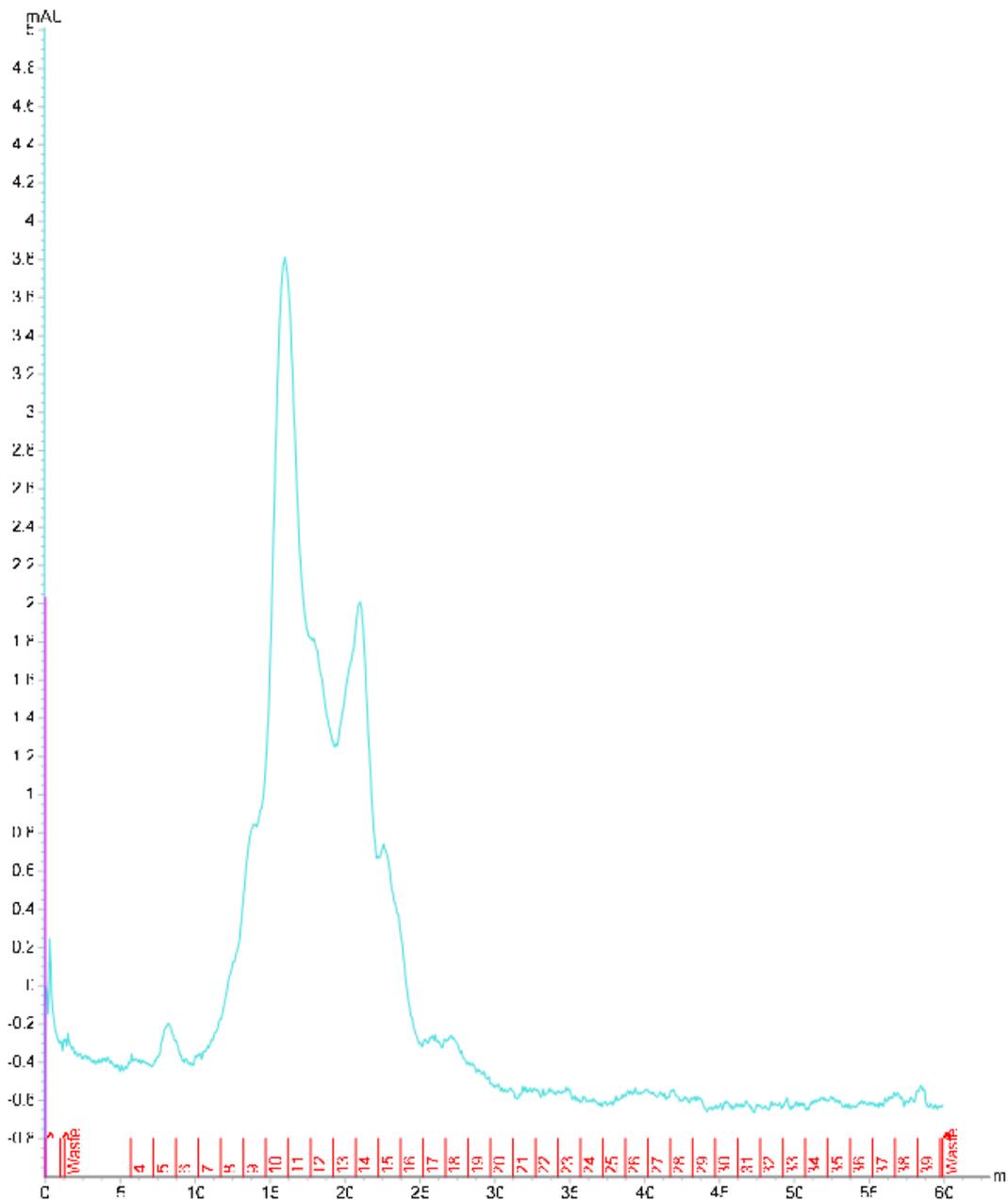


Figura 38. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do Anticorpo Acp. O anticorpo Acp na concentração de 1,3 mg/mL em um volume de 100 µl foi aplicado na coluna Superdex 200 10/300 GL. A eluição foi feita com tampão de fosfato. Um pico dominante foi observado por volta de 15 mL de eluição.

As frações referentes ao pico de absorbância (10 e 11) foram analisadas por meio de gel de poliacrilamida em condições não desnaturadas e Western blot (Figura 39). Foi observado uma banda no tamanho próximo ao do anticorpo em ambas as frações analisadas.

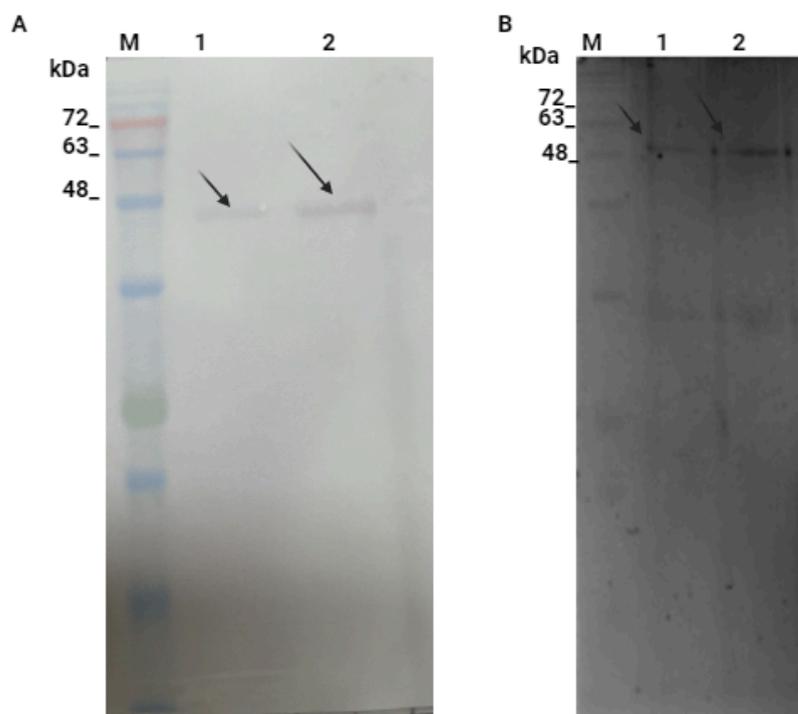


Figura 39. Western blot e gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes da da purificação do Anticorpo Acp no AKTA Pure utilizando a coluna coluna Superdex 200 10/300 GL. (A)Imunodeteção realizada com o anticorpo primário Anti-his produzido em camundongo seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-2.frações 10 e 11 correspondentes ao pico de U.V. As setas indicam as bandas correspondentes ao scFv. (B) Gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes com coloração feita com prata. M. Blueye prestained protein ladder (Lot 94964); 1-2.frações 10 e 11 correspondentes ao pico de U.V.

6. DISCUSSÃO

Com o surgimento da COVID-19, iniciou-se uma corrida para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e vacinas contra o SARS-CoV-2. Diversas tecnologias diferentes foram exploradas para o desenvolvimento de vacinas, desde as vacinas de vírus inativado até vacinas de

mRNA. Técnicas de screening de células B de pacientes foram utilizados para gerar os primeiros anticorpos monoclonais contra o RBD do SARS-CoV-2.

Apesar de que os anticorpos terapêuticos já são uma realidade desde 1990, na perspectiva de doenças infecciosas, poucos anticorpos monoclonais haviam sido aprovados antes da pandemia do SARS-CoV-2. O ibalizumab, comercializado sob o nome Trogarzo, foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento de uma doença infecciosa causada por vírus, a infecção pelo HIV-1 (BLAIR, 2020). Já em 2020, um coquetel de três anticorpos, itoltivimab, maftivimab, e odesivimab, foi aprovado para o tratamento da infecção pelo vírus do Ebola (MARKHAM, 2021). Com o surgimento da COVID-19, vários anticorpos foram aprovados para o uso emergencial.

O bamlanivimab foi um dos primeiros anticorpos monoclonais aprovados para o tratamento da COVID-19 pelo FDA. O anticorpo foi aprovado para o uso emergencial no final de 2020. O bamlanivimab se liga à proteína S do SARS-CoV-2, na região do RBD, bloqueando a interação com o ACE2 e a subsequente entrada do vírus (SHRESTHA *et al.*, 2023). Outros anticorpos tais como o coquetel REGEN-COV (casirivimab + imdevimab), regdanvimab e sotrovimab também foram aprovados.

Com o estudo da resposta imune elicitada pela vacinação foi observado que clones de anticorpos semelhantes são produzidos em diferentes indivíduos (BARNES, *et. al*, 2020). Além de que, muitos desses clones possuíam paratopos os quais reconhecem epitopos dentro da região do RBD, e ainda além, epitopos que contém os resíduos E484, N501e K417 que passaram a apresentar mutações que caracterizam as variantes Alfa, Beta e Gama. As variantes Beta e Gama possuem as seguintes mutações dentro do RBD:E484K, N501Y e K417N. Essas mutações foram relacionadas a casos de reinfecção e queda na capacidade de neutralização do soro de pessoas vacinadas com as vacinas com BNT162b2 (fabricado pela Pfizer) e mRNA-1273 (fabricado pela Moderna) (GARCIA-BELTRAN *et al.* 2021). Além disso, anticorpos monoclonais como o coquetel de Regeneron mostraram uma queda na capacidade de neutralização das variantes. O surgimento da variante Omicron, que acumulou cerca de 15 mutações dentro do RBD, agravou a preocupação com relação a perda da capacidade de neutralização dos anticorpos contra o RBD. Tanto que uso do anticorpo bamlanivimab administrado juntamente com o etesevimab foi descontinuado pelo FDA devido ao fato de a variante Omicron ter se tornado dominante em todo o mundo e esses anticorpos não serem tão efetivos diante dela (SHRESTHA *et al.*, 2023). O uso do coquetel REGEN-COV foi restringido pelo FDA devido sua baixa eficácia diante da variante Omicron (MAWAZI, *et al.*, 2021).

Apesar disso, o uso de anticorpos monoclonais para terapia e profilaxia contra doenças causadas por vírus pode se tornar um grande pilar na indústria de anticorpos. Mesmo para doenças infecciosas para as quais já existem vacinas, é necessário pensar em medicamentos para

serem administrados aqueles que possuem o sistema imunológico comprometido como pessoas transplantadas ou com doenças autoimunes. Essas pessoas não podem ser vacinadas com algumas vacinas ou se vacinadas não apresentam uma resposta humoral satisfatória.

Descrevemos aqui o desenvolvimento de dois fragmentos de anticorpos contra o SARS-CoV-2, que diferencialmente da maioria dos anticorpos terapêuticos que foram temporariamente aprovados, têm como alvo o FP e não o RBD que apresentou várias mutações ao longo da pandemia (ANDRE, *et al.*, 2023; GONG, *et al.*, 2022; SHIEHZADEGAN, *et al.*, 2021). A região da proteína S onde está o FP é extremamente conservada entre as variantes do SARS-CoV-2, incluindo a variante Ômicron. Além disso, o sítio de clivagem chamado de S2' que fica próximo ao FP é muito importante para a entrada do vírus nas células. Dado a importância do FP para o mecanismo de infecção do SARS-CoV-2 e de sua conservação dentre as diversas variantes que surgiram, a busca de medidas terapêuticas focadas neste alvo podem auxiliar no tratamento e prevenção de infecções pelo SARS-CoV-2 (BIANCHINI, *et al.*, 2023; LI, *et al.*, 2022).

Utilizamos a técnica de Phage Display para selecionar anticorpos contra o FP. A técnica de Phage Display apresenta algumas vantagens com relação a outras técnicas para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Uma delas é a possibilidade de gerar anticorpos completamente humanos, o que reduz efeitos adversos como a resposta imune a sequências de proteínas murinas. Além de que bibliotecas com mais de 10^{11} clones diferentes podem ser geradas o que garante que anticorpos com alta afinidade podem ser gerados para qualquer antígeno desejado (LEDSGAARD, *et al.*, 2022).

A partir da análise da sequência da Proteína S do vírus original de Wuhan foi sintetizado um Peptídeo de Fusão mimético (Figura 18). A sequência desse Peptídeo de Fusão mimético continha o sítio de clivagem S2' e também a região anterior a ele, já que essa região ficava mais exposta na estrutura tridimensional da Proteína S. Além disso foi adicionada uma ligação covalente entre dois resíduos de aminoácidos para que o Peptídeo de Fusão mantivesse uma conformação o mais similar possível com a conformação dentro da Proteína S. Para que uma seleção por Phage Display é fundamental que o antígeno esteja em uma conformação que se assimile a conformação nativa do antígeno (LEDSGAARD, *et al.*, 2022). A apresentação do antígeno é uma etapa crucial para o sucesso da seleção por Phage Display. A estratégia mais comum para apresentação do antígeno é imobilizá-lo diretamente sobre uma superfície. Entretanto, essa estratégia não é eficiente para antígenos que perdem sua conformação nativa quando adsorvidos, por isso optamos pela imobilização indireta, na qual exploramos a afinidade da molécula da estreptavidina pela biotina. Em nosso FP mimético foi adicionado a molécula da biotina, e a placa de ELISA utilizada a cada ciclo de seleção era sensibilizada com a estreptavidina.

Durante os 4 ciclos de seleção que foram realizados, a quantidade de fagos entrando na seleção (*input*) e a quantidade de fagos saindo da seleção foram tituladas (Tabela 4). Esperávamos ver uma diminuição do número de fagos no *output* a cada ciclo da seleção. Essa diferença não poderia ser observada no *input* porque realizamos a multiplicação dos fagos antes de iniciar cada ciclo de seleção. Os dados de *output* da seleção ácida e por competição mostram uma tendência de diminuição a cada ciclo com exceção do 4º ciclo de ambas as seleções (Tabela 4), onde houve um aumento do *output* quando comparado com o 3º ciclo. Ao olharmos a razão *input/output* podemos ver a quantidade de fagos que estão saindo da seleção a cada ciclo. Observamos que a cada ciclo de seleção, menos fagos estavam saindo da seleção, o que mostra que de fato o processo de seleção estava ocorrendo. No entanto, no ciclo 4 houve uma mudança abrupta, principalmente na seleção ácida, com um aumento do título de fagos no *output* sugerindo que o processo de seleção não estava mais em curso. Decidimos, portanto, concluir a seleção e analisar os fagos obtidos no ciclo 4.

O DNA correspondente ao VH e VL da biblioteca antes da seleção e do ciclo 4 de seleção foram submetidos ao sequenciamento de nova geração (NGS) na plataforma de Illumina. As sequências obtidas foram analisadas na ferramenta ATTILA. Na análise feita para o VH da seleção por competição obtivemos cerca de 300 mil sequências para o ciclo 0 de seleção, sendo que 57 % dessas sequências eram únicas. Já no ciclo 4 obtivemos um número similar de sequências, mas sendo que 6,2 % dessas sequências eram únicas. Assim, corroboramos que de fato estava ocorrendo uma redução da diversidade de sequências de anticorpos e que, portanto, estava ocorrendo o enriquecimento de sequências. O mesmo é válido para a seleção ácida do VH, na qual obtivemos, no ciclo 4, o percentual de 2,9 % de sequências únicas (Tabela 5).

Já para o VL na seleção por competição observamos uma redução do percentual de sequências únicas de 28,5% no ciclo 0 para 5,3% no ciclo 4. Na seleção ácida o percentual de sequências únicas no ciclo 4 foi de 2,8%. Mais uma vez ficou demonstrado que houve o enriquecimento de sequências únicas ao longo da nossa seleção.

Após essas análises, o ATTILA gerou um arquivo com as 20 sequências mais enriquecidas para o VH e para o VL. Entretanto ao observar as sequências mais enriquecidas constatamos que a mesma sequência se repetia no top 20. E ainda mais, que essa sequência que se repetia era uma sequência de anticorpo que era uma contaminação que já havia aparecido em outros experimentos de seleção realizados por nosso grupo com a mesma biblioteca. Então constatamos que as sequências do contaminante foram as mais enriquecidas no processo de seleção.

Para contornarmos esse problema, desconsideramos a sequência do contaminante e fizemos novamente o relatório mostrando as outras sequências que foram enriquecidas. Para seleção ácida e competição obtivemos a mesma sequência de VH, da Família VH4-34, com uma identidade germinal de 99,0%. Muitos anticorpos capazes de bloquear a interação do ACE2

possuem o VH codificado pelo segmento gênico VH4-34 (ROGERS, *et al.*, 2020; CHI, *et al.*, 2020; BARNES, *et al.*, 2020).

Para o VL obtivemos duas sequências enriquecidas, uma para seleção ácida e uma para competição. Para seleção ácida obtivemos um VL da família IGVK1-33*01 com identidade germinal de 85,3%. E para a seleção por competição obtivemos um VL da família IGVK4-1*01, com identidade germinal 97,0%. Devido à biblioteca utilizada na seleção ser naíve para o antígeno utilizado na seleção, já era de se esperar que não obtivéssemos anticorpos hipermutados pela exposição ao corona.

Esses dados de identidade germinal mostram que nossos anticorpos possuem sequências similares à germinal e não hipermutada. Outros anticorpos contra o FP descrito por LOW (2022) passaram por processos de hipermutação somáticas levando a alta afinidade e capacidade de reatividade cruzada. Com relação a anticorpos contra o RBD, já foram identificados anticorpos que possuem sequências virtualmente idênticas a seus germinais, enquanto que outros apresentavam altas taxas de hipermutação, demonstrando que existem anticorpos com sequências germinais que são reativos aos seus antígenos (JU, *et al.*, 2020). LIU (2020) isolaram anticorpos neutralizantes do plasma de pessoas infectadas, e interessante esses anticorpos possuem taxas de hipermutação somáticas bem abaixo dos valores isolados de pessoas saudáveis, corroborando que anticorpos derivados de sequências germinais podem ser neutralizantes (LIU, *et al.*, 2020).

A sequência do VH mais enriquecido nos dois procedimentos de seleção e dos VLs enriquecidos um em cada procedimento de seleção, foram combinadas para geração de dois fragmentos de anticorpo, que foram denominados como Aca (VL provindo da seleção ácida) e Acp (VL provindo da seleção por competição). Ambos os scFvs foram clonados no vetor pET-SUMO (Figura 21).

Esses fragmentos foram produzidos de forma heteróloga em *E. coli*. Sistemas de expressão em organismos procariontes apresentam algumas vantagens se comparado a sistemas em eucariotos. A expressão em eucariotos demanda um longo ciclo de produção com um altíssimo custo financeiro, além de ser demorado e laborioso. Enquanto que a expressão em bactérias apresentam taxas de crescimento bem mais altas e com custos de produção menores. *E. coli* é a bactéria de preferência para a expressão de fragmentos de anticorpos. (FRENZEL, *et al.*, 2013; RASHID, 2022).

A linhagem de *E. coli* utilizada para a expressão dos nossos scFvs foi a linhagem *Shuffle pLys Y*, que possui um ambiente citoplasmático mais parecido com a região do periplasma no sentido de ser um ambiente mais oxidante, diferente de outras linhagens de bactérias, onde o citoplasma é redutor. Esse citoplasma oxidante auxilia na formação de pontes dissulfeto que são fundamentais para a estabilidade de moléculas de imunoglobulinas (ROBINSON, *et al.*, 2015).

Nós obtivemos níveis de expressão dos scFvs Aca e Acp nas respectivas quantidades 2,2 e 2,8 mg/L (Tabela 6). além disso, nossas proteínas estavam na forma solúvel, sem agregados de alta massa molecular e provavelmente com o correto dobramento. Embora a formação de corpos de inclusão seja bastante comum para anticorpos no formato scFv, o uso de um citoplasma oxidante associado à fusão a uma sequência solubilizante pode ter sido eficiente para o êxito na produção de proteínas recombinantes solúveis. A sequência da SUMO presente em nosso cassete de expressão tinha como objetivo justamente auxiliar na redução da formação de corpos de inclusão, auxiliar no correto dobramento dos scFvs e aumentar a solubilidade destes. A expressão de proteínas no citoplasma bacteriano elimina a necessidade do processo de translocação entre membranas, processo que requer alto gasto energético, além de que proteínas heterólogas direcionadas a região do periplasma tendem a não alcançar seu correto dobramento, perdendo atividade biológica (ROBINSON, *et al.*, 2015).

Utilizando imunoenaios conseguimos demonstrar que os scFvs Aca e Acp foram capazes de se ligar ao FP mimético, com valores de EC50 de 1.149 η M, para o Aca e de 672 η M para o Acp (Figura 31). O Acp demonstrou uma capacidade de ligação quase duas vezes maior que o Aca. Com o ensaio de ELISA demonstramos que a partir do Phage Display com uma biblioteca naíve fomos capazes de selecionar scFvs capazes de reconhecer o antígeno utilizado na seleção. Portanto, mesmo lidando com a contaminação detectada na análise de enriquecimento, obtivemos anticorpos específicos para o FP.

O fato dos scFvs que obtemos serem capazes de reconhecer o antígeno utilizado na seleção valida o nosso método de seleção, mas esperávamos que estes também fossem capazes de reconhecer o FP no contexto da Proteína S inteira. Para essa validação dos nossos anticorpos, realizamos ensaios de ELISA contra a Proteína S das variantes Delta e Gama (Figura 32 e 33). Apesar de reativos com ambas as Proteínas S, constatamos que houve um aumento para o valor de EC50 encontrado para esses scFvs contra a Proteína S da variante Delta, de maneira que os scFvs se ligam com menos eficiência à Proteína S Delta. Esses valores corroboram os dados encontrados por Bianchini (2023) que demonstraram que anticorpos contra o FP são capazes de se ligar à Proteína S na conformação nativa.

Ao compararmos os EC50 do Acp em relação ao FP e a Proteína S da variante Gama obtivemos os valores de 672 η M e 424 η M respectivamente. Portanto, no caso da variante Gama, vemos uma diminuição do EC50, o que sugere que o scFv Acp se liga melhor a Proteína S da variante Gama do que ao FP.

Com relação ao anticorpo Aca, ele foi menos efetivo na ligação às duas versões da proteína S testadas. Enquanto o valor de EC50 encontrado para o FP era de 1.149 η M, esse valor subiu para 2.351 η M para a proteína S Delta e para 5.316 η M para a versão Gama. Portanto o scFv Acp apresentou valores de EC50 melhores em todos os ensaios realizados.

Embora o anticorpo Aca apresente uma queda na capacidade de ligação a Proteína S das variantes testadas, podemos observar que há uma melhor ligação no contexto da proteína S na superfície viral (Figura 34). É difícil saber se essa melhora na ligação é devido a proteína estar em sua conformação nativa na superfície do vírus ou se é devido ao ensaio ter sido realizado com a partícula do vírus original de Wuhan (Figura 34). É importante testarmos os scFvs contra a partícula viral das variantes para obtermos essa resposta.

No caso do Acp, se observarmos o valor de EC50 do anticorpo Acp contra a partícula viral vemos que o valor é compatível com o valor encontrado para a ligação ao FP. O EC50 contra o FP foi de 672 η M e para o vírus inativado foi de 557 η M. Portanto, ambos os scFvs são capazes de reconhecer a partícula viral do SARS-CoV-2 original de Wuhan, sendo que o Acp é aquele com mais afinidade.

Anticorpos contra o FP possuem uma afinidade relativamente baixa contra a Proteína S no estado anterior a ligação ao ACE2, e essa afinidade tende a melhorar quando a Proteína S está ligada ao receptor celular (BIANCHINI, *et al.*, 2023). o FP é um epitopo críptico e a ligação do ACE2 leva a mudanças conformacionais na Proteína S que deixam o FP mais exposto e disponível para ser reconhecido por anticorpos, o que pode ser uma explicação para a melhor capacidade de ligação dos anticorpos contra o FP no estado após a ligação ao ACE2. Portanto, pode ser que os valores de EC50 dos nossos scFvs melhorem ao testarmos essa ligação com a Proteína S na presença do ACE2 solúvel. A utilização de um anticorpo contra o RBD também pode ser uma alternativa. O fato de nossos anticorpos estarem no formato de scFv pode ser uma vantagem em relação ao reconhecimento de um epitopo críptico. Por ser uma molécula menor que um anticorpo inteiro, o scFv pode acessar regiões que estão parcialmente escondidas em relação a uma moléculas de anticorpo inteira.

Anticorpos contra o FP já caracterizados na literatura não impedirem a ligação do ACE2 a Proteína S mas impedirem a fusão de membranas e isso corrobora com a hipótese de que o mecanismo de neutralização desses anticorpos seja o impedimento estérico da clivagem do sítio S2' seja por TRRPSS ou por catepsinas. Deste modo, não ocorrerá a formação do núcleo de fusão e o vírus não será capaz de fundir seu envelope com a membrana plasmática ou endossomal. Na região do sítio de clivagem S2', o resíduo de aminoácido arginina na posição 815 é a posição do sítio de clivagem. Geralmente anticorpos contra o FP são neutralizantes se o seu paratopo cobrir esse resíduo de aminoácido (BIANCHINI, *et al.*, 2023, LOW, *et al.*, 2022).

Uma tendência encontrada para anticorpos contra o FP é que estes apresentam uma baixa potência de neutralização *in vitro* se comparados a anticorpos contra o RBD. Apesar da baixa potência, anticorpos contra o FP são de amplo espectro, capazes de neutralizar as diversas variantes do SARS-coV-2 e até mesmo coronavírus de outros gêneros além dos Betacoronavírus, enquanto que anticorpos contra o RBD em sua maioria não são eficientes contra as variantes e

outros gêneros de coronavírus (BIANCHINI, *et al.*, 2023; DACON, *et al.*, 2022). Dado que no último século três coronavírus saltaram a barreira entre espécies causando surtos, é fundamental desenvolver anticorpos que possam neutralizar simultaneamente diversos coronavírus. Além disso, uma formulação terapêutica pode contar com mais de um anticorpo, e anticorpos anti-FP podem compor com outros anticorpos neutralizantes produzindo formulações mais eficientes na clínica.

A rápida taxa de surgimento de variantes do SARS-CoV-2 também nos conduz a considerar o desenvolvimento de anticorpos com alvos fora do RBD (LI, *et al.*, 2022). As primeiras variantes a surgirem possuíam poucas alterações dentro do RBD, como por exemplo a variante Gama que possuía apenas 3 mutações no RBD (WANG, *et al.*, 2021). Entretanto, essa variante foi associada a casos de reinfecção e também de infecção de pessoas vacinadas. Já as variantes que surgiram por último como o caso da Omicron e suas subvariantes, acumulavam mais de 15 mutações dentro do RBD além de outras mutações dentro da proteína S. Essas variantes levaram a necessidade de atualização da composição das vacinas para garantir a imunidade da população.

Além de serem capazes de se ligarem às Proteínas S das variantes do SARS-CoV-2 como demonstrado aqui, há anticorpos contra o FP são capazes de se ligarem a Proteína de todos os outros coronavírus humanos, e alguns deles são capazes de reconhecer até mesmo coronavírus de outros animais (DACON, *et al.*, 2022). Anticorpos contra a Subunidade S2 da Proteína S são pouco investigados, embora essa região seja bem conservada entre os coronavírus e possa conter epitopos imunodominantes que podem induzir a produção de anticorpos amplamente neutralizantes (LI, *et al.*, 2022) .

Os dados apresentados aqui corroboram com dados da literatura que descrevem anticorpos contra o FP. Diversos estudos mostraram que anticorpos contra outras regiões da Proteína S podem ser eficientes em neutralizar a infecção pelo SARS-CoV-2. Ressaltamos aqui a região do FP que é extremamente conservada entre as variantes do SARS-CoV-2 e entre outros coronavírus. Esse fato associado a sua importância para o mecanismo de infecção do vírus demonstra o potencial que anticorpos contra o FP tem para a neutralização do SARS-CoV-2, suas variantes e também outros coronavírus de outros gêneros que não o Beta (BIANCHINI, *et al.*, 2023; DACON, *et al.*, 2022).

7. CONCLUSÃO

Os coronavírus são um grupo de vírus que têm causado preocupação devido à sua ocorrência em humanos. Sete coronavírus foram capazes de causar doenças em humanos, e três deles causaram epidemias nos últimos 20 anos. Portanto, a possibilidade de novos coronavírus se

tornarem capazes de infectar humanos e o constante surgimento de novas versões do SARS-CoV-2 traz à tona a necessidade de se desenvolver anticorpos que sejam relativos aos diversos gêneros de coronavírus e suas variantes.

Estudos da resposta imunológica, tanto a vacina como a infecção, mostram que células B de memória que produzem anticorpos cross-reativos aos coronavírus não são comuns. Embora a tecnologias desenvolvidas para as vacinas de mRNA permita a atualização do imunizante contra as variantes, é fundamental que novos epítomos sejam incluídos na formulação das vacinas. Os dados apresentados aqui mostram que conseguimos desenvolver anticorpos contra o FP capazes de se ligar ao SARS-CoV-2 original (Wuhan) e às Proteínas S das variantes Delta e Gama. A ligação de anticorpos ao FP pode impedir a etapa de fusão de membranas no processo de infecção do vírus.

Embora tenhamos demonstrado a capacidade dos scFvs de se ligarem a partícula viral do SARS-CoV-2, é importante medirmos com precisão a afinidade destes anticorpos contra a Proteína S em suas diversas apresentações. Além disso, é fundamental realizarmos um ensaio de neutralização para confirmarmos o potencial terapêutico destes anticorpos. Ainda não foi possível realizar esse ensaio devido a limitações relacionadas à biossegurança, já que não possuímos um laboratório de biossegurança nível 3 e acesso a partícula viral do SARS-CoV-2 ativa. Alternativamente, poderíamos realizar o ensaio de neutralização com pseudovírus, que exige o nível 2 de biossegurança. Estamos em contato com colaboradores em São Paulo que possuem acesso a partículas de pseudovírus de diversas variantes do SARS-CoV-2. Nosso colaborador Pedro Viera (Unicamp) possui os materiais necessários para a realização do ensaio de neutralização com a partícula viral ativa. Apesar de não ter conseguido realizar esses experimentos no contexto desse trabalho, esperamos realizar esses ensaios em breve.

Para entendermos a interação dos scFvs com o FP é importante que futuramente realizemos a cristalografia deles e também destes juntamente com FP. Esses dados podem nos ajudar a entender o provável mecanismo de neutralização destes anticorpos e nos auxiliar a propor mudanças para a melhoria da afinidade e potência desses anticorpos.

8. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. ; ANDREW, H.; SHIV, P. **Imunologia Celular e Molecular**. Grupo GEN, 2019. *E-book*. ISBN 9788595150355. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595150355/>. Acesso em: 29 nov. 2023.
2. AGGARWAL, N. R.; BEATY, L. E.; BENNETT, T. D.; CARLSON, N. E.; MAYER, D. A.; MOLINA, K. C.; GINDE, A. A. Change in effectiveness of sotrovimab for preventing hospitalization and mortality for at-risk COVID-19 outpatients during an Omicron BA. 1 and BA. 1.1-predominant phase. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 128, p. 310-317, 2023.
3. ANDRE, M.; LAU, L.S.; POKHAREL, M.D.; RAMELOW, J.; OWENS, F.; SOUCHAK, J.; AKKAQUI, J.; ALES, E.; BROWN, H.; SHIL, R.; NAZAIRE, V. From Alpha to Omicron: How Different Variants of Concern of the SARS-Coronavirus-2 Impacted the World. **Biology**, v.12, p. 1267, 2023.
4. BARDERAS, R.; BENITO-PEÑA, E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, p. 2475-2479, 2019.
5. BARNES, C.O; JETTE, C.A.; ABERNATHY, M.E.; DAM, K.A.; ESSWEIN, S.R.; GRISTICK, H.B.; MALYUTINI, A.; SHARAF, N.; HUEY-TUBMAN, K.; LEE, Y.; ROBBIANI, D.; NUSSENZEIG, M.; WEST, A.; BJORKMAN, P. Structural classification of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain suggests vaccine and therapeutic strategies. **bioRxiv** [Preprint], 2020.
6. BIANCHINI, F.; CRIVELLI, V.; ABERNATHY, M. E.; GUERRA, C.; PALUS, M.; MURI, J; ROBBIANI, D. F. Human neutralizing antibodies to cold linear epitopes and subdomain 1 of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Science immunology**, v. 8, n. 81, p. eade0958, 2023.
7. BILLETTA, R.; LOBUGLIO, A.F. Chimeric antibodies. **International Reviews of Immunology**, v. 10, n. 2-3, p. 165-176, 1993.
8. BLAIR, HA. Ibalizumab: A Review in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. **Drugs**. 2020 Feb;80(2):189-196. doi: 10.1007/s40265-020-01258-3. PMID: 31970712.
9. CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature reviews microbiology**, v.17, pp.181-192, 2019.
10. CHI, X.; YAN, R.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; ZHANG, Y.; HAO, M., ZHANG, Z.; FAN, P.; DONG, Y.; YANG, Y; CHEN, Z. A potent neutralizing human antibody reveals the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 as a site of vulnerability. **BioRxiv**, pp.2020-05, 2020.
11. CHUNG, C.; KUDCHODKAR, S.; CHUNG, C.; PARK, Y.; XU, Z.; PARDI, N.; MUTHUMANI, K. Expanding the Reach of Monoclonal Antibodies: A Review of Synthetic Nucleic Acid Delivery in Immunotherapy. **Antibodies**, v. 12, n. 3, p. 46, 2023.
12. CATHCART, A.L.; HAVENAR-DAUGHTON, C.; LEMPP, F. A.; MA, D.; SCHMID, M. A.; AGOSTINI, M. L.; HEBNER, C. M. The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2. **biorxiv**, p. 2021.03. 09.434607, 2021.
13. DACON, C.; TUCKER, C.; PENG, L.; LEE, C.C.D.; LIN, T.H.; YUAN, M.; TAN, J. Broadly neutralizing antibodies target the coronavirus fusion peptide. **Science**, v. 377, n. 6607, p. 728-735, 2022.
14. DE-SOUZA, M. T.; BRÍGIDO, M. DE M.; MARANHÃO, A. Q. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 2. ed. Brasília: Editora UnB, 2016.

15. DOUGAN, M.; AZIZAD , M.; CHEN, P.; FELDMAN, B.; FRIEMAN, M.; IGBINADOR, A.; GOTTLIEB, R. L. Bectelovimab, alone or together with bamlanivimab and etesevimab, as a broadly neutralizing monoclonal antibody treatment for mild to moderate, ambulatory COVID-19. **MedRxiv**, p. 2022.03. 10.22272100, 2022.
16. FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 217, 2013.
17. FOCOSI, D.; McCONNELL, S.; CASADEVALL, A.; CAPPELLO, E.; VALDISERRA, G.; TUCCORI, M. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2. **The Lancet Infectious Diseases**, 2022.
18. FRANÇA, R. K. A. D. O., SILVA, J.M.; RODRIGUES, L.S.; SOKOLOWSKEI, D.; BRIGIDO, M. M.;MARANHÃO, A. Q. New anti-flavivirus fusion loop human antibodies with Zika virus-neutralizing potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7805, 2022.
19. GARCIA-BELTRAN, W. F.; LAM, E. C.; DENIS, K.S.; NITIDO, A. D.; GARCIA, Z. H.; HAUSER, B. M.; BALAZS, A.B. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. **Cell**, v. 184, n. 9, p. 2372-2383. e9, 2021.
20. GALLOWAY, S.E.; PAUL, P.; MACCANNELL, D.R.; JOHANSSON, M.A.; BROOKS, J.T.; MACNEIL, A.; SLAYTON, R.B.; TONG, S.; SILK, B.J.; ARMSTRONG, G.L.; BIGGERSTAFF, M. Emergence of SARS-CoV-2 b. 1.1. 7 lineage—united states, december 29, 2020–january 12-2021. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 3, p. 95, 2021.
21. GONG, W.; PARKKILA, S.; WU, X.; ASPATWAR, A. SARS-CoV-2 variants and COVID-19 vaccines: Current challenges and future strategies. **International reviews of immunology**, v. 42, n. 6, p. 393-414, 2023.
22. HANSEN, J.; BAUM, A.; PASCAL, K.E.; RUSSO, V.; GIORDANO, S.; WLOGA, E.; KYRATSOUS, C.A. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. **Science**, v. 369, n. 6506, p. 1010-1014, 2020.
23. HENTZIEN, M.; AUTRAN, B.; PIROTH , L.; YAZDANPANAH , Y.; CALMY , A. A monoclonal antibody stands out against omicron subvariants: a call to action for a wider access to bebtelovimab. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1278, 2022.
24. HEO, Young-A. Sotrovimab: first approval. **Drugs**, v. 82, n. 4, p. 477-484, 2022.
25. HILLEN, H.S.; KOKIC, G.; FARNUNG, L.; DIENEMAN, C.; TEGUNOV, D.; CRAMER, P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. **Nature**, 584(7819), pp.154-156, 2020.
26. HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T.S.; HERRLER, G.; WU, N.H.; NITSCHKE, A. MÜLLER, M.A. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, 181(2), pp.271-280, 2020.
27. HOLMES, E.C.;GOLDSTEIN, S.A.; RASMUSSEN, A.L.; ROBERTSON, D.L.; CRITS-CHRISTOPH, A.; WERTHEIM, J.O.; ANTHONY, S.J.; BAECLAY, W.S.; BONI, M.F.; DOHERTY, P.C.; FARRAR,J.The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, pp.4848-4856, 2021.
28. HOU, Y. J.; CHIBA, S.; HALFMANN, P.; EHRE, C.; KURODA, M.; DINNON, K. H.; BARIC, R. S. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. **Science**, v. 370, n. 6523, p. 1464-1468, 2020.
29. JAHANSHAHLU, L.; REZAEI, N.Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110337, 2020.
- 30.JACKSON, C.B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H.Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, 23(1), pp.3-20, 2022.
31. JU, B.; ZHANG, Q.; GE, J.; WANG, R.; SUN, J.; GE, X.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, B.;

- SONG, S.; TANG, X. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. **Nature**, 584(7819), pp.115-119.
32. KANNAN, S.R.; SPRATT, A.N.; SHARNA, K.; GOYAL, R.; SÖNNERBORG, A.; APPARSUNDARAM, S.; LORSON, C.L.; BYRAREDDY, S.N.; SINGH, K. Complex mutation pattern of omicron ba. 2: Evading antibodies without losing receptor interactions. **International journal of molecular sciences**, v. 23, no. 10: 5534, 2022
 33. KIM, C.; RYU, D. K.; LEE, J.; KIM, Y. I.; SEO, J. M.; KIM, Y. G.; LEE, S.Y.A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 288, 2021
 34. KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; MALIK, Y. S.; CHAICUMPA, W. Modulation of dengue/zika virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in zika virus infection. **Frontiers in immunology**, 9, 597.
 35. KO, J. Y.; DANIELSON, M.L.; TOWN, M.; DERADO, G.; GREENLUND, K.J.; KIRLEY, P.D.; COVID-NET Investigation. Risk factors for COVID-19-associated hospitalization: COVID-19-associated hospitalization surveillance network and behavioral risk factor surveillance system. **medRxiv**, p. 2020.07. 27.20161810, 2020.
 36. LEDSGAARD, L.; LJUNGARS, A.; RIMBAULT, C.; SØRENSEN, C.V.; TULIKA, T.; WADE, J.; LAUSTSEN, A.H. Advances in antibody phage display technology. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2151-2169, 2022.
 37. LEVIN, M.J.; USTIANOWSKI, A.; DE WIT, S.; LAUNAY, O.; AVILA, M.; TEMPLETON, A.; ESSER, M. T. Intramuscular AZD7442 (tixagevimab–cilgavimab) for prevention of COVID-19. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 23, p. 2188-2200, 2022.
 38. LEVY, R.; WEISS, R.; CHEN, G.; IVERSON, B. L.; GEORGIU, G. Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. **Protein expression and purification**, v. 23, n. 2, p. 338-347, 2001.
 39. LI, C. J.; CHAO, T. L.; CHANG, T. Y.; HSIAO, C.C., LU, D.C.; CHIANG, Y. W.; CHANG, S. C. Neutralizing monoclonal antibodies inhibit SARS-CoV-2 infection through blocking membrane fusion. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01814-21, 2022.
 40. LIU, L.; WANG, P.; NAIR, M. S.; YU, J.; RAPP, M.; WANG, Q.; HO, D. D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 450-456, 2020.
 41. LOW, J.; JERAK, J.; TORTORICI, M.; McCALLUM, M.; PINTO, D.; CASSOTTA, A.; FOGLIERINI, M.; MELE, F.; ABDELNARI, R.; WEYNAND, B.; NOACK, J. ACE2-binding exposes the SARS-CoV-2 fusion peptide to broadly neutralizing coronavirus antibodies. **Science**, 377(6607), pp.735-742.
 42. LU, R. M.; HWANG, Y. C.; LIU, I. J.; LEE, C. C.; TSAI, H. Z.; LI, H. J.; WU, H. C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of biomedical science**, v. 27, n. 1, p. 1-30, 2020.
 43. MARANHÃO, A.; SILVA, H.; SILVA, M.; FRANÇA, R.; DE LEO, T.; DIAS-BARUFFI, M.; BRIGIDO, M. Discovering selected antibodies from deep-sequenced phage-display antibody library using ATTILA. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 1177932220915240, 2020.
 44. MARKHAM, A. REGN-EB3: First Approval. **Drugs** 81, 175–178 (2021). <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01452-3>
 45. MAWAZI, S.M.; KHAN, J.; OTHMAN, N.; ALOLAYAN, S. O.; ALAHMADI, Y. M.; THAGFAN, S. S. A.; MARZO, R. R.; SAEI, M. REGEN-COV and COVID-19, update

- on the drug profile and FDA status: A mini-review and bibliometric study. **Journal of Public Health Research**, v. 10, n. 2_suppl, p. jphr. 2021.2930, 2021.
46. NATHAN, R.; SHAWA, I.; TORRE, D.L.I.; PUSTIZZI, J. M., HAUSTRUP, N.; PATEL, D. R.; HUHN, G.A. Narrative review of the clinical practicalities of bamlanivimab and etesevimab antibody therapies for SARS-CoV-2. *Infectious diseases and therapy*, v. 10, n. 4, p. 1933-1947, 2021.
 47. NING, L.; ABAGNA, H.B.; JIANG, Q.; LIU, S.; HUANG, J. Development and application of therapeutic antibodies against COVID-19. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 6, p. 1486, 2021.
 48. NGUYEN, Y.; FIAHAULT, A.; CHAVAROT, N.; MELENOTTE, C.; CHEMINANT, M.; DESCHAMPS, P.; MOUTHON, L. Pre-exposure prophylaxis with tixagevimab and cilgavimab (Evusheld) for COVID-19 among 1112 severely immunocompromised patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 12, p. 1654. e1-1654. e4, 2022.
 49. OU, X.; LIU, Y.; LEI, X.; LI, P.; MI, D.; REN, L.; QIAN, Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, 2020.
 50. PARUMS, D.V. The XBB. 1.5 ('Kraken') Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its Rapid Global Spread. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 29, pp.e939580-1
 51. PLANAS, D.; VEYER, D.; BAIDALIUK, A.; STAROPOLI, I.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; RAJAH, M. M.; SCHWARTZ, O. Reduced sensitivity of infectious SARS-CoV-2 variant B. 1.617. 2 to monoclonal antibodies and sera from convalescent and vaccinated individuals. **Biorxiv**, p. 2021.05. 26.445838, 2021.
 52. RASHID, M.H. Full-length recombinant antibodies from Escherichia coli: production, characterization, effector function (Fc) engineering, and clinical evaluation. **Mabs**, vol. 14, no. 1, p. 2111748, 2022.
 53. READER, R. H.; WORKMAN, R. G.; MADDISON, B. C.; GOUGH, K. C. Advances in the production and batch reformatting of phage antibody libraries. **Molecular biotechnology**, v. 61, p. 801-815, 2019.
 54. ROBINSON, M. P.; KE, N.; LOBSTEIN, J.; PETERSON, C.; SZKODNY, A.; MANSELL, T.J.; BERKMAN, M. Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 8072, 2015.
 55. ROGERS, T.F.; ZHAO, F.; HUANG, D.; BEUTLER, N.; BURNS, A.; HE, W.T.; LIMBO, O.; SMITH, C.; SONG, G.; WOEHLE, J.; YANG, L. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. **Science**, 369(6506), pp.956-963, 2020.
 56. SCHATZ, D.; SWANSON, P. V (D) J recombination: mechanisms of initiation. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 167-202, 2011.
 57. SHI, R.; SHAN, C.; DUAN, X.; CHEN, Z.; LIU, P.; SONG, J.; YAN, J. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*, v. 584, n. 7819, p. 120-124, 2020.
 58. SHIEHZADEGAN, S.; ALAGHEMAND, N.; FOX, M.; VENKETARAMAN, V. Analysis of the delta variant B. 1.617. 2 COVID-19. **Clinics and practice**, v. 11, n. 4, p. 778-784, 2021.
 59. SHRESTHA, L.B., FOSTER, C.; RAWLINSON, W.; TEDLA, N.; BULL, R.A. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA. 1 to BA. 5: implications for immune escape and transmission. **Reviews in Medical Virology**, v.32, n.5, p.e2381.
 60. SHRESTHA, J; SHERCHAN, R. Bamlanivimab. [Updated 2023 Jan 30]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576376/>

61. SYED, Y.Y. Regdanvimab: first approval. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2133-2137, 2021.
62. SZTAIN, T.; AHN, S. H.; BOGETTI, A. T.; CASALINO, L.; GOLDSMITH, J. A.; SEITZ, E.; AMARO, R. E. A glycan gate controls opening of the SARS-CoV-2 spike protein. **Nature chemistry**, v. 13, n. 10, p. 963-968, 2021.
63. TALREJA, S.; PANDEY, S.; KUMAR, S. A review on Monoclonal antibody and its application in biotechnology. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 12, n. 1, p. 49-53, 2020.
64. VASIREDDY, D.; VANAPARTHY, R.; MOHAN, G.; MALAYALA, S. V.; ATLURI, P. Review of COVID-19 variants and COVID-19 vaccine efficacy: what the clinician should know?. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 13, n. 6, p. 317, 2021.
65. XU, Y.; LOU, Z.; LIU, Y.; PANG, H.; TIEN, P.; GAO, G.; RAO, Z. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. **Journal of Biological Chemistry**, 279(47), p.49414-49419, 2004.
66. WANG, M.Y.; ZHAO, R.; GAO, L.J.; GAO, X.F.; WANG, D.P.; CAO, J.M. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 10, p.587269, 2020.
67. WANG, P.; NAIR, M. S.; LIU, L.; IKETANI, S.; LUO, Y.; GUO, Y.; HO, D. D. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B. 1.351 and B. 1.1. 7. **Nature**, v. 593, n. 7857, p. 130-135, 2021.
68. WESTENDORF, K.; ŽENTELLIS, S.; WANG, L.; FOSTER, D.; VAILLANCOURT, P.; WIGGIN, M.; BARNHART, B.C. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. **Cell reports**, v. 39, n. 7, 2022.
69. ZHANG, Q.; XIANG, R.; HUO, S.; ZHOU, Y.; JIANG, S.; WANG, Q.; YU, F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, 6(1), p.233, 2021.
70. ZHOU, P.; SHI, Z. SARS-CoV-2 spillover events. **Science**, v. 371, n. 6525, p. 120-122, 2021
71. ZOST, J.; GIILCHUK, P.; CASE, J. B.; BINSHTAIN, E.; CHEN, R. E.; NKOLOLA, J. P.; CROWE, J. E. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 443-449, 2020.