



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Patologia Molecular

Caracterização e classificação de epítomos de anticorpos monoclonais selecionados por Phage Display com potencial neutralizante anti-SARS-CoV-2.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e desenvolvida no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia da mesma Universidade.

Orientando: Juan Fernando Riasco Palacios

Orientador: Prof. Dr. André Moraes Nicola

Brasília

2023

Lista de figuras

Figura 1. Arquitetura molecular do vírus SARS-CoV-2.....	14
Figura 2. Estrutura do trímero de proteína de pico SARS-CoV-2.....	16
Figura 3. Versão geral esquemática das variantes do SARS-CoV-2.	20
Figura 4. Uso de anticorpos monoclonais neutralizantes para prevenir a interação das células-alvo SARS-CoV-2.	23
Figura 5. Identificação, seleção e fabricação de anticorpos monoclonais neutralizantes.	25
Figura 6. Vetor pET-21a. Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor.....	37
Figura 7. Valores de razão média entre sinal positivo.	49
Figura 8. Gel de agarose 1% dos clones amplificados.	53
Figura 9. Análise de produção dos scFvs na bactéria SHuffle® pLys Y.....	55
Figura 10. SDS-PAGE de expressão dos scFvs.....	56
Figura 11. SDS-PAGE de Purificação dos scFvs.....	58
Figura 12. Western-Blot após purificação para análise de identidade dos scFv.	59
Figura 13. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com vetores incluindo a D1614G e as sequências para as variantes e linhagens e sublinhagens (I).....	73
Figura 14. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com vetores incluindo a D1614G e as sequências para as variantes e linhagens e sublinhagens(II)	74
Figura 15. Mapeamento de epítomos.....	79
Figura 16. Desenho tridimensional dos modos A e B de domínio de ligação ao receptor SARS-Cov- 2.	83

Lista de gráficos

Gráfico 1. Intensidade de ligação em escala de cinzas (0 a 250 pixels).	80
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação, seleção e fabricação de anticorpos monoclonais neutralizantes.	26
Tabela 2. Sequência de primers para clonagem dos scFvs no pET-21a.	36
Tabela 3. Descrição dos controles para o ensaio de ligação dos anticorpos às diferentes variantes por citometria de fluxo.	46
Tabela 4. Desenho experimental para o ensaio de ligação dos anticorpos às diferentes variantes por citometria de fluxo.	47
Tabela 5. Esquema de adstringência de seleção por Phage Display.	51
Tabela 6. Sequência dos primers reversos para amplificação dos scFvs.	52
Tabela 7. scFv selecionados por Phage Display para produção e purificação.	52
Tabela 8. Testes funcionais de ligação e bloqueio dos scFvs produzidos nas variantes Alfa (UK), Beta (AS) e Gama (P1). Fonte: Arquivo do LabMIB.	57
Tabela 9. Descrição de características dos clones selecionados.	60
Tabela 10. Resultados de ensaios de bloqueio por ELISA realizados pela equipe do LabMIB, UnB.	67
Tabela 11. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com a mutação (D1614G), e as diferentes variantes e sublinhagens.	72
Tabela 12. Epítomos de anticorpos alinhados à sequência RBD.	82

Resumo

O vírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico responsável da COVID-19 e que produziu a pandemia global que tomou conta do mundo em 2020. Para SARS-CoV-2, a proteína spike na superfície do vírus é o alvo principal da maioria das vacinas atuais. A proteína spike é responsável pela capacidade do vírus de entrar nas células humanas e, portanto, é um componente crucial do mecanismo infeccioso do vírus. Ao provocar uma resposta imune contra epítomos específicos na proteína spike, as vacinas visam impedir que o vírus infecte as células e se espalhe pelo corpo. Compreender os epítomos específicos visados pelas vacinas é fundamental para desenvolver e melhorar as vacinas e para entender por que algumas variantes do SARS-CoV-2 podem ser menos suscetíveis às vacinas atuais.

Dentro deste contexto o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o COVID-19 e foi elaborado o projeto “Caracterização e classificação de epítomos de anticorpos monoclonais selecionados por Phage Display com potencial neutralizante anti-SARS-CoV-2” dentro do macroprojeto “Anticorpos na terapia da COVID-19: estudo clínico de fase IIa, com plasma de convalescentes e geração de anticorpos monoclonais humanos”, em colaboração com a Fundação Hemocentro, o Hospital Universitário de Brasília (HUB) e o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). Nele, anticorpos foram selecionados pelo método de Phage Display a partir de RNA extraído de plasma de pacientes convalescentes. Foram produzidos e purificados anticorpos no formato scFv, e após análise de resultados foram selecionados 6 anticorpos distintos com sequências únicas, e caracterizados como classe 1 e clonótipos 2. Estes também são conhecidos como clonótipos públicos IGHV3-53/3-66 com características de neutralização específicas, seligando a múltiplos locais vulneráveis do vírus na sua região RBD. Assim, os achados obtidos viabilizaram destacar a importância das mutações somáticas na capacidade de ligação e neutralização dos anticorpos. Este dado foi confirmado com a identificação dos epítomos destes anticorpos, processo que permitiu conhecer o local de ligação no RBD, especificamente em sua região RBS, e hipotetizar a possível forma de ligação dos mesmos a partir de estudos de alinhamento de sequências das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) com anticorpos com alta percentagem de identidade e com estruturas descritas. A partir do conseguido aqui, os próximos passos implicaram continuar desenvolvendo uma estratégia combinatória que envolva a especificidade e funcionalidade dos anticorpos, e a geração de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 no formato IGG1.

Palavras chave: anticorpos, SARS-CoV-2, RBD, caracterização, citometria de fluxo e mapeamento de epítomos.

Summary

The SARS-CoV-2 virus is the etiological agent responsible for COVID-19 and which produced the global pandemic that took over the world in 2020. For SARS-CoV-2, the spike protein on the surface of the virus is the main target of most current vaccines. The spike protein is responsible for the virus's ability to enter human cells and is therefore a crucial component of the virus's infectious mechanism. By eliciting an immune response against specific epitopes on the spike protein, vaccines aim to prevent the virus from infecting cells and spreading throughout the body. Understanding the specific epitopes targeted by vaccines is critical to developing and improving vaccines and to understanding why some variants of SARS-CoV-2 may be less susceptible to current vaccines.

Within this context, the development of monoclonal antibodies for COVID-19 and the project "Characterization and classification of epitopes of monoclonal antibodies selected by Phage Display with anti-SARS-CoV-2 neutralizing potential" was elaborated within the macroproject "Antibodies in the therapy of COVID-19: Phase IIa clinical study, with plasma from convalescents and generation of human monoclonal antibodies", in collaboration with the Hemocentro Foundation, the University Hospital of Brasília (HUB) and the Regional Hospital of Asa Norte (HRAN). In it antibodies were selected by the Phage Display method from RNA extracted from the plasma of convalescent patients. Antibodies were produced and purified in the scFv format, and after analyzing the results, 06 different antibodies with unique sequences were selected, and characterized as class 1 and clonotypes 2. These are also known as public IGHV3- 53/3-66 clonotypes with specific neutralizing characteristics, binding to multiple vulnerable sites of the virus in its RBD region. Thus, the findings made it possible to highlight the importance of somatic mutations in the ability to bind and neutralize antibodies. This data was confirmed with the identification of the epitopes of these antibodies, a process that made it possible to know the binding site in the RBD, specifically in the RBS region, and to hypothesize the possible way of binding them based on studies of alignment of sequences with antibodies with a high percentage of identity and with described structures. Based on what was achieved here, the next steps would involve continuing to develop a combinatorial strategy that involves the specificity and functionality of antibodies, and the generation of specific antibodies against SARS-CoV-2 in the IGG1 format.

Keywords: Antibodies, SARS-CoV-2, RBD, characterization, flow cytometry and epitope mapping.

Resumen

El virus SARS-CoV-2 es el agente etiológico responsable del COVID-19 y que produjo la pandemia mundial que se apoderó del mundo en el año 2020. Para el SARS-CoV-2, la proteína espiga en la superficie del virus es el objetivo principal de la mayoría de las vacunas actuales. La proteína espiga es responsable de la capacidad del virus para ingresar a las células humanas y, por lo tanto, es un componente crucial del mecanismo infeccioso del virus. Al provocar una respuesta inmune contra epítomos específicos en la proteína de punta, las vacunas tienen como objetivo evitar que el virus infecte las células y se propague por todo el cuerpo. Comprender los epítomos específicos a los que se dirigen las vacunas es fundamental para desarrollar y mejorar las vacunas y para comprender por qué algunas variantes del SARS-CoV-2 pueden ser menos susceptibles a las vacunas actuales.

En este contexto, dentro del macroproyecto “Anticuerpos en la terapia”, se elaboró el desarrollo de anticuerpos monoclonales para COVID-19 y el proyecto “Caracterización y clasificación de epítomos de anticuerpos monoclonales seleccionados por Phage Display con potencial neutralizante anti-SARS-CoV-2”. de COVID-19: Estudio clínico Fase IIa, con plasma de convalecientes y generación de anticuerpos monoclonales humanos”, en colaboración con la Fundación Hemocentro, el Hospital Universitario de Brasilia (HUB) y el Hospital Regional de Asa Norte (HRAN). En él se seleccionaron anticuerpos por el método Phage Display a partir de ARN extraído del plasma de pacientes convalecientes. Los anticuerpos se produjeron y purificaron en formato scFv y, después del análisis de los resultados, se seleccionaron 06 anticuerpos distintos con secuencias únicas y se caracterizaron como clonotipos de clase 1 y 2. Estos también se conocen como clonotipos públicos IGHV3-53/3-66 con neutralización específica características, uniéndose a múltiples sitios vulnerables del virus en su región RBD. Así, los hallazgos permitieron resaltar la importancia de las mutaciones somáticas en la capacidad de unión y neutralización de anticuerpos. Este dato se confirmó con la identificación de los epítomos de estos anticuerpos, proceso que permitió conocer el sitio de unión en el RBD, específicamente en su región RBS, e hipotetizar la posible forma de unión a partir de estudios de alineamiento de secuencias de las regiones que determinan la complementariedad (CDRs) con anticuerpos con un alto porcentaje de identidad y con estructuras descritas. Con base en lo que se logró aquí, los próximos pasos implicaría continuar desarrollando una estrategia combinatoria que involucren la especificidad y funcionalidad de los anticuerpos, y la generación de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2 en el formato IGG1.

Palabras clave: anticuerpos, SARS-CoV-2, RBD, caracterización, citometría de flujo y mapeo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Coronavírus	10
2.2 COVID19 & SARS-CoV-2	11
2.3 Anticorpos Monoclonais	21
2.4 Metodologias contemporâneas de análise de anticorpos monoclonais	27
2.4.1 Citometria de fluxo	27
2.4.2 Mapeamento de epítomos	30
3 JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS	33
Objetivo geral	33
Objetivos específicos	33
5 MÉTODOS	34
5.1 Extração de RNA de linfócitos de doadores convalescentes	34
5.2 Produção de fragmentos de anticorpos recombinantes - scFvs	34
5.2.1 Sequenciamento Sanger	35
5.2.2 Identificação das sequências únicas	35
5.2.3 Desenho de genes	35
5.2.4 Clonagem no vetor pET21a. Transformação e seleção de clones	36
5.2.5 Expressão heteróloga de anticorpos scFvs recombinantes	40
5.3 Purificação de fragmentos de anticorpos recombinantes - scFvs	42
5.4 Dot-Blot (DB) para a detecção de anticorpos	42
5.5 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante	43
5.6 Western-Blot: imunodetecção de proteínas	44
5.7 Quantificação dos anticorpos recombinantes	44
5.8 Conjugação dos anticorpos recombinantes à biotina	45
5.9 Ensaio de ligação do scFv à proteína Spike e variantes do SARS-CoV-2 por Citometria de Fluxo	45
5.10 Mapeamento de epítomos	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Extração de RNA de linfócitos de doadores convalescentes	49
6.2 Produção e purificação	50
6.3 Caracterização de proteínas scFvs purificadas	59
6.4 Ensaio de ligação do scFv à proteína Spike do SARS-CoV-2 por citometria de fluxo	70
6.5 Identificação de epítomos dos anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2	78
7 CONCLUSÕES	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9 ANEXOS I	97
Anexo 2	100

1.INTRODUÇÃO

O coronavírus é um vírus que pode causar uma doença respiratória chamada COVID-19. O vírus se espalha através das gotículas respiratórias que são liberadas quando uma pessoa infectada tem tosse ou espirra. Essas gotas podem cair na boca ou no nariz de pessoas próximas ou ser inaladas nos pulmões. A doença COVID-19 pode causar sintomas leves, como febre, tosse e dificuldade em respirar. Em alguns casos, a doença pode ser mais grave, e causar pneumonia, insuficiência respiratória e morte. O coronavírus mudou várias vezes desde que apareceu pela primeira vez em 2019. Estas mutações resultaram em novas variantes do vírus, algumas das quais são mais contagiosas e mais graves do que as variantes anteriores. A variante mais recente do coronavírus, conhecida como Ômicron , é a mais contagiosa que já foi vista até agora. O Ômicron também é mais provável que cause sintomas graves em pessoas vacinadas.

O mapeamento de epítomos é uma técnica usada para identificar as partes do vírus que podem ser atacadas por anticorpos. Esta informação pode ser usada para desenvolver anticorpos monoclonais, que são um tipo de tratamento que pode ajudar a prevenir ou tratar a COVID-19. Os anticorpos monoclonais são proteínas que são fabricadas no laboratório e que se assemelham aos anticorpos produzidos pelo corpo humano. Os anticorpos monoclonais podem se ligar ao vírus e neutralizá-lo, o que pode ajudar a prevenir a infecção ou reduzir a gravidade da doença. Os anticorpos monoclonais estão sendo usados atualmente para tratar pessoas com COVID-19 grave. Também estão sendo estudados como possível tratamento preventivo para as pessoas que correm maior risco de desenvolver a doença. O mapeamento de epítomos é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Esta técnica pode ajudar a identificar as partes do vírus que são mais suscetíveis à neutralização por anticorpos, o que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra a COVID-19.

Assim matizado pelo avanço do cenário pandêmico, pelas dolorosas perdas familiares, configurou-se a impreterível necessidade de encaminhar nossos esforços ao desenvolvimento do macroprojeto “Anticorpos na terapia da COVID 19: estudo clínico de fase IIa com plasma de convalescentes e geração de anticorpos monoclonais humanos”, em colaboração com a Fundação Hemocentro, o Hospital Universitário de Brasília (HUB) e o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), mas agora visando desenvolver o projeto de pesquisa de doutorado nesta linha. Dito isto, o presente documento se dedica à produção, purificação e identificação de epítomos de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-SARS-CoV-2 selecionados por Phage Display, organiza a intenção de produzir, purificar anticorpos no formato scFv anti- SARS-CoV-2, realizar ensaios de ligação dos scFvs à proteína S e variantes do SARS- CoV-2, ensaios de bloqueio da ligação do Spike a ACE2 (Enzima de Conversão de Angiotensina 2) e mapeamento de epítomos.

O projeto recebeu parecer favorável da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa CONEP (CAAE 30931820.30000.5558) permitindo o desenvolvimento de suas atividades cumprindo com toda as regulações pertinentes

2.REFERENCIAL TEÓRICO.

2.1 Coronavírus.

Os coronavírus, da família *Coronaviridae*, são vírus de RNA de fita simples de sentido positivo variando de 26 a 32 kilobases de comprimento. Eles são extremamente diversos, causando distúrbios respiratórios, digestivos, hepáticos e neurológicos em uma ampla gama de espécies animais, incluindo humanos, que podem levar a doenças graves. Os CoVs são classificados em quatro famílias: Alfa coronavírus, Betacoronavírus, coronavírus e Deltacoronavírus (AHMED; QUADEER; MCKAY, 2020). Desde a descoberta do primeiro coronavírus - o vírus da bronquite infecciosa (IBV) isolado de aves - até 2020, seis CoVs têm sido conhecidos por infectar humanos, incluindo CoV 229E humano, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV.

Em termos de betacoronavírus, dois despertaram o especial interesse da comunidade científica e do mundo nos últimos anos: a causa da síndrome respiratória aguda grave (conhecida como SARS-CoV) e a causa da síndrome respiratória do Oriente Médio (conhecida como MERS-CoV) (WEI; LI; CUI, 2020). MERS-CoV, detectado pela primeira vez na Arábia Saudita em 2012, foi responsável por 2.494 casos de infecção confirmados em laboratório e 858 mortes desde setembro de 2012, incluindo 38 mortes após uma única introdução na Coreia do Sul (World-Health-Organization, 2022). O SARS-CoV foi descoberto no sul da China e causou uma epidemia em 2003. A SARS foi relatada em 8.098 casos em todo o mundo, com 774 mortes e uma taxa de mortalidade de 14% a 15% (World-Health-Organization, 2022).

Vários estudos sobre SARS-CoV implicam que as respostas imunes humorais e mediadas por células desempenham um papel protetor. As respostas de anticorpos contra a proteína S, a proteína mais exposta do SARS-CoV, protegem os camundongos

da infecção. Além disso, os anticorpos produzidos contra a proteína N do SARS-CoV, uma proteína altamente imunogênica e abundantemente expressa durante a infecção, foram particularmente frequentes em indivíduos infectados por SARS-CoV em vários estudos. A resposta de anticorpos, embora eficaz, mostrou-se ser de curta duração em pacientes convalescentes de SARS-CoV. As respostas das células T, por outro lado, demonstraram fornecer proteção a longo prazo, até 11 anos após a infecção, e despertaram interesse em uma potencial vacina contra o SARS-CoV.

2.2 COVID19 & SARS-CoV-2.

A COVID-19, conhecida como doença do novo coronavírus, causado pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2) filogeneticamente semelhante ao SARS-CoV, tem ocasionado a primeira pandemia do século XXI. A pandemia foi declarada emergência de saúde global no dia 30 de janeiro de 2020 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), causando terríveis taxas globais de morbidade e mortalidade devido aos graves danos a vários órgãos dos pacientes (AHMED; QUADEER; MCKAY, 2020; FARRERA-SOLER et al., 2020; HENDREN et al., 2020). O SARS-CoV-2 se espalha de pessoa para pessoa, através de gotículas respiratórias produzidas por pessoas infectadas quando tosse ou espirram. O contato com fômites também é possível, mas não se acredita que este seja o principal modo de transmissão. O vírus tem um período médio de incubação de 5,2 dias e cada caso infecta em média 2,2 pessoas (HENDREN et al., 2020). Febre, tosse seca, dificuldades respiratórias (dispneia), dor de cabeça e pneumonia são sintomas clínicos comuns nos pacientes com COVID-19, podendo resultar em insuficiência respiratória progressiva devido ao dano alveolar e até mesmo morte (ZHOU et al., 2020).

Uma proporção significativa de pacientes internados no hospital desenvolve uma síndrome cardiovascular aguda por COVID-19, que pode se apresentar de várias maneiras. A mais comum se manifesta como uma lesão cardíaca aguda com

cardiomiopatia, arritmias ventriculares e instabilidade hemodinâmica. Miocardite, lesão microvascular, lesão sistêmica mediada por citocinas ou lesão relacionada ao estresse, são todas as possíveis causas dessa lesão (HENDREN et al., 2020). Embora não tenha sido comprovado histologicamente, o SARS-CoV-2 tem a capacidade de se replicar diretamente dentro de cardiomiócitos e pericitos, causando miocardite viral (RYSZEWSKA; NIEWIADOMSKI, 2021).

Muitas pessoas estão sobrevivendo à fase aguda do COVID-19, mas existem evidências crescentes de que os efeitos a longo prazo da infecção por SARS-CoV-2 podem ter um impacto na qualidade de vida de uma pessoa e na capacidade de retornar ao trabalho. Dispneia, fadiga, perda de paladar e olfato, comprometimento cognitivo, dor torácica e artralgia são sintomas comuns. A infecção por SARS-CoV-2 causa danos celulares ao desencadear a resposta imune inata, que inclui a produção de citocinas pró-inflamatórias e a indução de um estado pró-coagulante. Esses sintomas podem aparecer pela primeira vez, reaparecer ou persistir por mais de 4 semanas após o início da infecção (PIERCE et al., 2022). Assim, desde o surgimento do coronavírus 2 como uma grande ameaça à saúde pública global, e dado o constante surgimento de novas variantes. Muitos estudos concentraram esforços na descoberta e no desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos monoclonais neutralizantes (mAbs) contra a proteína Spike (S) do SARS -CoV-2.

Após descartar a gripe humana aviária, o SARS-CoV e o MERS-CoV, pacientes apresentando pneumonia viral, encontrados epidemiologicamente associados ao mercado de frutos do mar de Huanan em Wuhan, na província de Hubei, na China, foram diagnosticados com a ajuda de sequenciamento de nova geração (NGS), com um novo coronavírus que infecta os humanos, provisoriamente denominado novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV) (AHMED; QUADEER; MCKAY, 2020; FARRERA-SOLER et al., 2020). A OMS o chamou de SARS-CoV-2 porque tinha

uma sequência genética que era pelo menos 70% semelhante ao SARS-CoV. A China registrou mais de 5.900 casos confirmados e mais de 9.000 prováveis de infecção por 2019-nCoV em 33 províncias ou localidades chinesas em 28 de janeiro de 2020, com 106 mortes. Até 18 de outubro de 2023, 771.407.825 de casos foram reportados e cerca de 7 milhões de pessoas morreram por COVID-19 (World-Health-Organization, 2023).

Na atualidade, aproximadamente 3,9 milhões de cepas mutantes foram encontradas em 7,6 milhões de sequências de SARS-CoV-2 (World-Health-Organization, 2023). As variantes de SARS-CoV-2 substituíram o tipo selvagem e tornaram-se as linhagens dominantes globalmente a taxa de mutação do SARS-CoV-2 de cerca de 1×10^2 a 2×10^6 mutações por nucleotídeo por ciclo de replicação são consistentes com as estimativas anteriores em outros betacoronavírus (MARKOV et al., 2023). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou essas variantes como Variantes de Preocupação (VOCs), Variantes de Interesse (VOIs) e Variantes Sob Monitoramento (VUMs) com base em suas características e capacidade de transmissão, bem como na resistência vacinal. Em 15 de março de 2023, a OMS considera as variantes Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron (B.1.1.529) como VOC previamente circulantes. A (antiga sub variante) XBB.1.5 (pela nomenclatura de Pango) foi classificada como VOI sendo a única classificada como tal até 30 de março. Até aquele mesmo dia sete linhagens (pela nomenclatura de Pango) eram classificadas como VUM: BA.2.75; CH.1.1; BQ.1; XBB; XBB.1.16;XBB.1.9.1;eXBF (<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>).

A proteína Spike é uma proteína trimérica de 600 kDa fortemente glicosilada, com 66 glicanos N-ligados, tornando-a uma das maiores proteínas de fusão de classe I conhecidas. As subunidades S1 e S2, bem como uma única âncora transmembrana (TM), compõem cada protômero S (Figura 1) (WALLS et al., 2020)

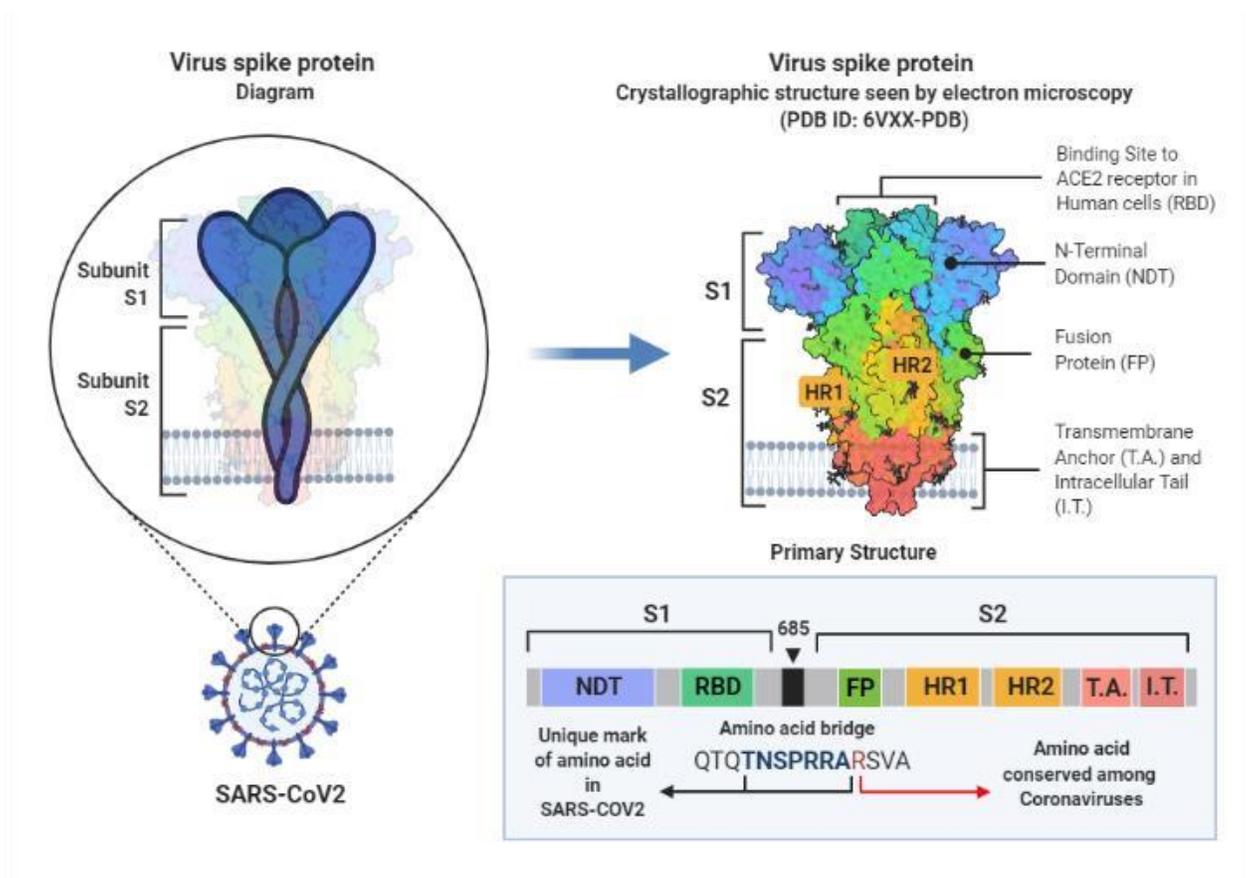


Figura 1. Arquitetura molecular do vírus SARS-CoV-2.

Vírus representativo, reconstruído projetando a proteína de perfusão Spike e suas subunidades S1 e S2.
Fonte: Adaptado de BioRender

O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S foi escolhido como como alvo de interesse primário para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, mas é importante entender quais foram as questões centrais que levaram a escolha de este domínio de ligação como alvo de interesse. O RBD liga-se à enzima conversora de angiotensina do receptor de superfície celular 2 (ACE2), que é necessária para a fusão da membrana (LU et al., 2020; WANG et al., 2020b; YAO et al., 2020). Como bem se conhece, o principal alvo dos anticorpos neutralizantes nos diferentes coronavírus é a proteína Spike (S), entendida como uma glicoproteína homotrimérica que está ancorada na membrana viral. Diversos autores como (WALLS et al., 2020; WRAPP et al., 2020) mostraram que a proteína S do SARS-CoV-2 possui considerável homologia estrutural

com a do SARS-CoV, consistindo em dois subdomínios: o domínio N-terminal S1, que contém o domínio N-terminal (NTD) e o RBD para a enzima conversora de angiotensina receptora da célula hospedeira 2 (ACE2) e o domínio S2, que contém o peptídeo de fusão.

Semelhante a outros vírus contendo proteínas de fusão de classe 1 como pode ser o vírus HIV-1, RSV ou Lassa, a proteína S sofre uma alteração conformacional e clivagem proteolítica após a ligação ao receptor da célula hospedeira de um estado de pré-fusão para um estado de pós-fusão, permitindo a fusão de vírus e membranas celulares alvo (LI, [s.d.]; SHANG et al., 2020). De acordo com (JIANG; HILLYER; DU, 2020; SANDERS et al., 2013; YAO et al., 2020; GAO et al., 2022), quando a proteína S é expressa como proteínas solúveis recombinantes, as proteínas de fusão de classe 1 geralmente têm a propensão de mudar para um estado de pós-fusão. No entanto, a maioria dos epítomos dos anticorpos neutralizantes estão presentes na conformação de pré-fusão.

As primeiras tentativas de produzir anticorpos neutralizantes foram centradas na reavaliação de anticorpos monoclonais específicos do SARS-CoV obtidos após o surto de 2003, que poderiam neutralizar o SARS-CoV-2. Embora anticorpos monoclonais que neutralizam o SARS-CoV-2 tenham sido identificados, a maioria dos anticorpos neutralizantes (NAbs) do SARS-CoV não se ligaram à proteína S do SARS-CoV-2 nem neutralizam o vírus (PINTO et al., 2020; TIAN et al., 2020; WANG et al., 2020b; WRAPP et al., 2020). A partir disso, a ênfase mudou do isolamento de novos NAbs de SARS-CoV-2 de pacientes com COVID-19 recuperados para a neutralização cruzada de NAbs de SARS-CoV (JU et al., 2020a; ROGERS et al., 2020).

A partir dos fragmentos da proteína S contendo o RBD foram produzidos NAbs que podem neutralizar o SARS-CoV-2, visando diferentes epítomos do RBD (JU et al., 2020a; ROGERS et al., 2020; WRAPP et al., 2020). NAbs monoclonais direcionados a epítomos que não sejam o RBD são uma parte importante de qualquer coquetel de anticorpos terapêuticos devido ao rápido aparecimento de mutações de escape no RBD de SARS-CoV e MERS (TANG et al., 2014).

A proteína S foi resolvida em várias conformações de pré-fusão, com os três RBDs exibindo diferentes orientações: para cima ou para baixo (WALLS et al., 2020; WRAPP et al., 2020) (Figura 2). Somente quando os RBDs estão em uma posição para cima, os sítios de ligação ao receptor se tornam visíveis. Em proteínas S de SARS-CoV-2 expressas de forma recombinante, as conformações "RBD down", "one RBD up" e "two-RBD up" foram observadas (YAO et al., 2020). Quando ativado, S segue uma via clássica para proteínas de fusão de classe I, liberando sua subunidade S1 e inserindo o peptídeo de fusão (FP) na membrana da célula alvo. S se transforma em uma forma de pós-fusão em forma de agulha após a fusão da membrana, com três hélices se entrelaçando coaxialmente (GAO et al., 2022; WANG et al., 2020b)

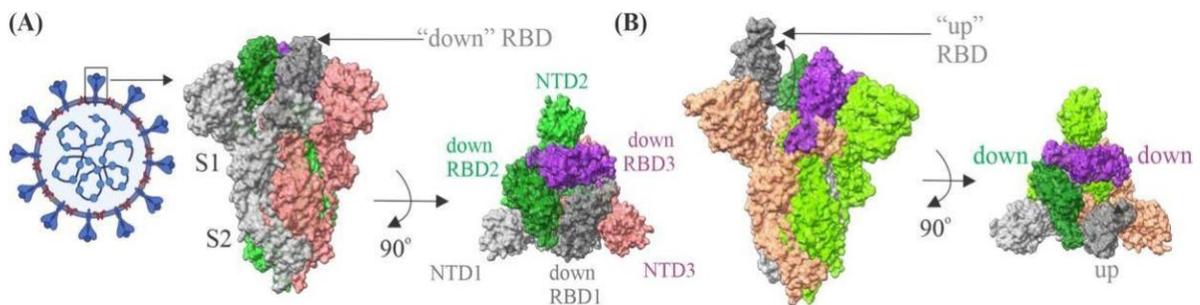


Figura 2. Estrutura do trímico de proteína de pico SARS-CoV-2.

Esquerda: (A) vista lateral do autodomínio de pico trimérico com 3 RBDs na conformação para baixo; direita: vista superior da proteína de pico trimérico mostrando RBDs em cinza, verde floresta e orquídea (PDB: 6VXX). (B) Esquerda: vista lateral do autodomínio de pico trimérico com 1 RBD na conformação ascendente; direita: vista superior da proteína de pico trimérico mostrando 1 RBD ascendente em cinza. Fonte: (MITTAL; KHATTRI; VERMA, 2022).

É importante dizer que a proteína Spike é responsável pela capacidade do vírus de entrar nas células humanas e, portanto, acaba sendo um componente crucial do mecanismo infeccioso do vírus. Isto se vincula com a ação das vacinas no corpo, que ao provocar uma resposta imune contra epítopos específicos na proteína Spike, impede que o vírus infecte as células e se espalhe pelo corpo. Os epítopos da vacina SARS-CoV-2 referem-se a regiões específicas nas proteínas da superfície do vírus que são direcionadas pelo sistema imunológico para provocar uma resposta imune. Essas regiões, também conhecidas como antígenos, são as partes do vírus que são reconhecidas pelo sistema imunológico do organismo, desencadeando a produção de anticorpos (CASCELLA et al., 2022).

Como resultado das pequenas alterações nas sequências genéticas ao longo do tempo e do processo de disseminação, surgem as variantes do SARS-CoV-2. Entre as variantes mais estudadas e definidas encontra-se a variante Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron, todas as quais tem se espalhado no mundo de forma rápida (Figura 3).

A variante britânica Alfa foi identificada pela primeira vez no Reino Unido em setembro de 2020. É conhecido por ter uma taxa de transmissão mais alta do que a cepa original. Foi associada com maior transmissibilidade e aumento do risco de hospitalização e morte. Especificamente, a variante B.1.1.7 com mutação na proteína Spike foi diretamente associada ao aumento da transmissibilidade do vírus (GALLOWAY et al., 2021; VOLZ et al., 2021).

Outra variante, Beta, foi identificada pela primeira vez na África do Sul, também a finais de 2020, no mês de novembro. Essa variante apresenta alterações em vários pontos-chave do vírus, incluindo o receptor para entrada nas células humanas, o que pode aumentar sua capacidade de infectar pessoas (TEGALLY et al., 2021). A partir disso, a linhagem B.1.351 foi associada à diminuição da eficácia de algumas vacinas e ao aumento da resistência à imunidade adquirida em infecções anteriores (WANG et al., 2021).

Vale citar aqui a variante brasileira, Gama, identificada no final de 2020 e início de 2021 e que também como as anteriores, se espalhou para outros países da América Latina e Caribe (FARIA et al., 2021; WANG et al., 2021). Gama, também conhecida como linhagem P.1, tem várias mutações na proteína Spike, incluindo uma mutação que foi associada ao aumento da resistência à imunidade adquirida por infecção ou vacinação anterior.

A variante Delta (B.1.617.2) foi detectada pela primeira vez na Índia. Esta variante foi responsável pela segunda onda mortal de infecções por Covid-19 em abril de 2021. A variante Delta foi inicialmente considerada uma variante de interesse. No entanto, essa variante se espalhou rapidamente em todo o mundo, levando a ser classificada como um VOC em maio de 2021. A variante B.1.617.2 abriga dez mutações (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) na proteína Spike (HARDER et al., 2021).

Por fim, a quinta variante de preocupação B.1.1.529, também designada como a variante Ômicron pela OMS, foi identificada pela primeira vez na África do Sul em 23 de novembro de 2021, após um aumento no número de casos de COVID-19 (KARIM; KARIM, 2021; VAUGHAN, 2021). A principal preocupação com a variante Ômicron, como pode ser inferido até aqui, é que ela tem um grande número de mutações no gene da proteína Spike, que é o alvo principal das vacinas contra a COVID-19. Essas mutações podem tornar a variante Ômicron mais transmissível e potencialmente reduzir a eficácia das vacinas existentes contra a COVID-19. Espalhando-se rapidamente a outros países, no final de dezembro a Ômicron era a cepa dominante nos Estados Unidos, sendo catalogada pela CDC como uma "variante de preocupação". Desde então, várias sublinhagens (sub variantes) da Ômicron foram identificadas por cientistas e pesquisadores em todo o mundo, que são designadas por códigos como AY.x ou BA.x, onde x é um número sequencial que identifica uma sublinhagem específica (KARIM; KARIM, 2021).

Ômicron tem mais de 30 alterações na proteína Spike do vírus (CALLAWAY, 2021). As mutações relatadas incluem T91 no envelope, P13L, E31del, R32del, S33del, R203K, G204R na proteína do nucleocapsídeo, D3G, Q19E, A63T na matriz, N211del/L212I, Y145del, Y144del, Y143del, G142D, T95I, V70del, H69del, A67V no domínio N-terminal do pico, Y505H, N501Y, Q498R, G496S, Q493R, E484A, T478K, S477N, G446S, N440K, K417N, S375F, S373P, S371L, G339D no domínio de ligação ao receptor do Spike, D796Y no peptídeo de fusão do Spike, L981F, N969K, Q954H na repetição heptal 1 do

Spike, bem como várias outras mutações nas proteínas não estruturais e na proteína Spike (GU et al., 2022). Segundo as pesquisas mais recentes, Ômicron apresenta um aumento de 13 vezes na capacidade de infecção viral e é 2,8 vezes mais infeccioso do que a variante Delta (CALLAWAY, 2021; CHEN et al., 2022).

A sub-variante recombinante Ômicron XBB.1.5 do SARS-CoV-2 traz consigo uma substituição adicional a Ser486Pro, em comparação com XBB.1 e superando BQ.1.1 e outras 25 sublinhagens XBB (SELVAVINAYAGAM et al., 2023). Experimentos desenvolvidos por (YUE et al., 2023) demonstraram que a sublinhagem XBB.1.5 tem uma afinidade de ligação significativamente maior para ACE2 do que BQ.1.1 e XVV/XVV.1. em comparação com BQ.1.1 e XBB/XBB.1 em amostras de plasma convalescente de BA.1, BA.5 e BF.7. As sub variantes XBB.1 e XBB.1.5 mostram evasão comparável aos anticorpos monoclonais Tixagevimab/cilgavimab, Bebtelovimab e Sotrovimab usados no estudo (WESTENDORF et al., 2022; ZOST et al., 2020), mas isso indica diferentes transmissibilidades e maior afinidade de ligação ao receptor o que levaria de fato a um maior aumento na taxa de transmissibilidade. Além que a forte ligação de ACE2 a XBB.1.5 também pode conferir resistência a mutações subsequentes que escapam à resposta imune.

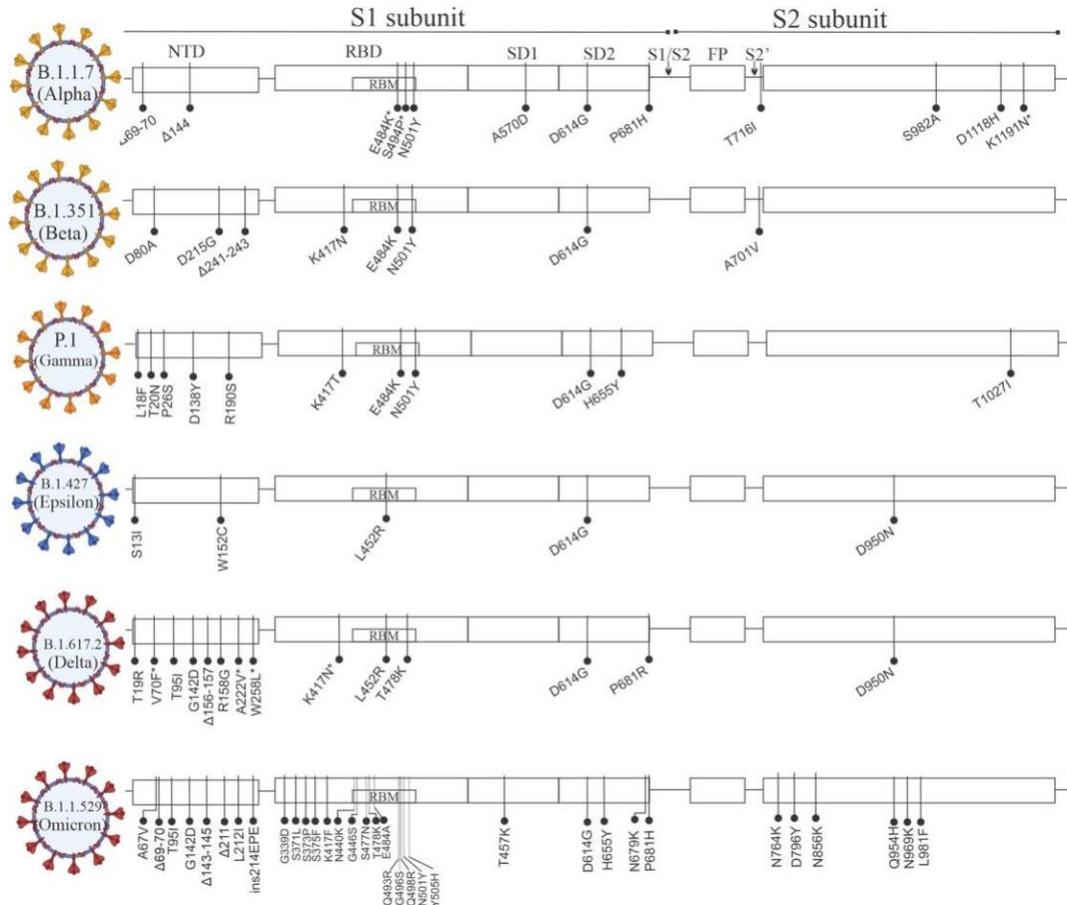


Figura 3. Versão geral esquemática das variantes do SARS-CoV-2.

A variante sendo monitorada B.1.1.7 (Alfa), B.1.351 (Beta), P1 (Gama) e B.1.427 (Epsilon) e a variante de preocupação B.1.617.2 (Delta) e B.1.1. 529 (Ômicron) mostrando modificações de aminoácidos em comparação com a sequência ancestral de Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2). FP, peptídeo de fusão; NTD, domínio N-terminal; RBD, domínio de ligação ao receptor; RBM, motivo de ligação ao receptor; SARS-CoV-2, Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2. Fonte: (MITTAL; KHATTRI; VERMA, 2022)

É importante observar que nem todas as sub variantes têm um impacto significativo na gravidade da doença ou na transmissão do vírus, e as pesquisas continuam para entender o verdadeiro impacto dessas alterações na sequência genética do vírus. O estudo da diferenciação genética é importante para entender a evolução e disseminação do SARS-CoV-2, bem como para rastrear o surgimento de cepas do vírus novas e potencialmente mais virulentas ou resistentes a medicamentos (HOFFMANN et al., 2020; XU et al., 2020). As diferenças genômicas entre as variantes incluem alterações nos

aminoácidos das proteínas do vírus que podem afetar sua capacidade de infectar células humanas, sua capacidade de escapar de uma resposta imune e sua capacidade de ser detectada por testes de diagnóstico. Essas variações podem afetar a eficácia das vacinas e das medidas de prevenção e controle. Portanto, é importante continuar monitorando e estudando as variantes para ajustar as estratégias de prevenção e controle da COVID-19.

Algumas das mutações mais conhecidas na proteína Spike incluem, a modo de exemplo, a N501Y, encontrada em diversas variantes, incluindo B.1.1.7 e B.1.351, com maior transmissibilidade e maior resistência à imunidade adquirida por infecção prévia ou vacinação (DAVIES et al., 2021; WALENSKY; WALKE; FAUCI, 2021). A mutação E484K, presente na variante P.1, foi associada ao aumento da resistência à imunidade adquirida por infecção prévia ou vacinação. K417N, E484Q e N439K são mutações da variante B.1.351 e foram associadas à diminuição da eficácia de algumas vacinas (MUNRO et al., 2021; POLACK et al., 2020; SONG et al., 2018).

2.3 Anticorpos Monoclonais.

A similaridade entre SARS-CoV e o SARS-CoV-2 ajudou a acelerar a avaliação de várias terapias promissoras, incluindo agentes antivirais, inibidores da interleucina-6 e plasma de convalescentes (HENDREN et al., 2020). Além disso, foi rapidamente assumido que os anticorpos neutralizantes encontrados em pacientes com SARS-CoV durante a epidemia de 2003 também poderiam neutralizar o SARS-CoV-2 (FARRERA-SOLER et al., 2020). Vários anticorpos monoclonais (mAbs) neutralizantes foram desenvolvidos e demonstraram seu potencial terapêutico no tratamento de infecções por coronavírus durante surtos anteriores de SARS e MERS (WU et al., 2020).

Em 11 de janeiro de 2020, foi publicada a sequência genética do SARS-CoV-2, iniciando uma corrida global para desenvolver uma vacina contra a doença. Desde então, os mAbs terapêuticos para o tratamento com COVID-19 foram desenvolvidos a uma velocidade nunca vista antes em nenhuma doença, sendo a proteína Spike (S) do SARS-

CoV-2 o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (WALLS et al., 2020). Como consequência, a maioria dos mAbs contra o SARS-CoV-2 que foram usados em ensaios clínicos ou estão em estágios avançados de desenvolvimento têm como alvo o domínio de ligação ao receptor da glicoproteína Spike (RBD) ou o domínio N-terminal (NTD) (GAO et al., 2022; SINGH et al., 2022).

Por causa do surgimento das muitas variantes do SARS-CoV-2 em diferentes partes do mundo, surgiram preocupações sobre a eficácia desses mAbs. Estudos recentes relataram que muitos NAbs específicos para NTD são ineficazes contra as variantes emergentes, enquanto os NABs específicos para RBD são variavelmente eficazes contra as variantes emergentes e VOCs. Como monoterapia, a maioria dos NAbs terapêuticos teve sua atividade neutralizante completa, significativamente reduzida contra as variantes emergentes de SARS-CoV-2 com as mutações E484K/Q ou L452R (SINGH et al., 2022), devido a isto na atualidade os cinco fármacos contra a Covid-19 aprovados pelo FDA baseados em anticorpos monoclonais já foram retirados do mercado. Assim as terapias de combinação que consistem em um coquetel de NAbs direcionados a epítomos distintos não sobrepostos no RBD mostraram ser muito promissoras contra o SARS-CoV-2 e variantes (FARRERA- SOLER et al., 2020; SINGH et al., 2022). Além disso, a monoterapia com os NABs de ligação ao núcleo RBD recém-identificados SARS 2-38 e LY-CoV1404 neutralizam todos os VOCs do SARS-CoV-2 (Figura 4). Por tanto, vários NABs direcionados a epítomos RBD conservados estão surgindo como candidatos terapêuticos promissores para combater o SARS-CoV-2 e suas variantes (KUMAR; CHANDELE; SHARMA, 2021).

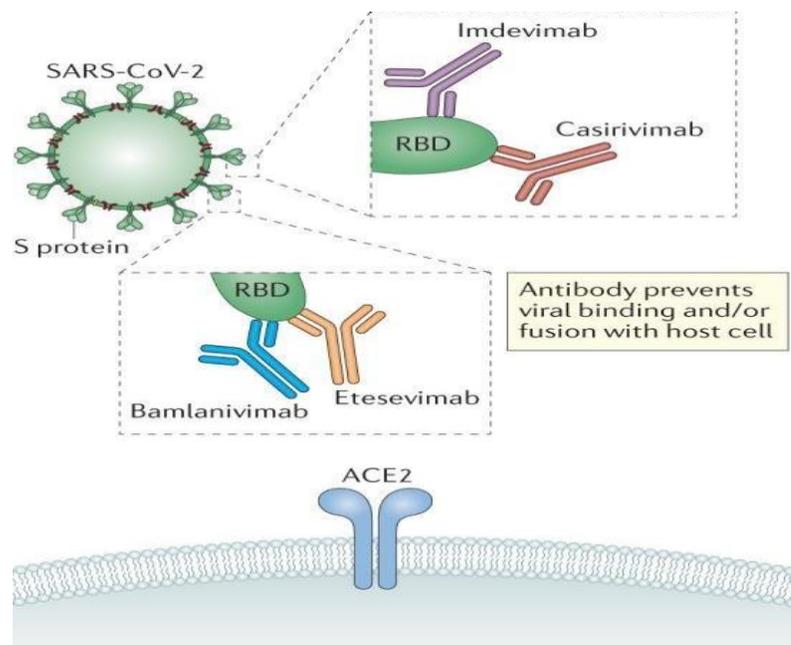


Figura 4. Uso de anticorpos monoclonais neutralizantes para prevenir a interação das células-alvo SARS-CoV-2.

O domínio de ligação ao receptor do SARS-CoV-2 é o alvo dos anticorpos monoclonais neutralizantes (mAbs) que estão sendo desenvolvidos para combater a COVID-19. A enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) nas células hospedeiras alvo serve como receptor da proteína S, e os mAbs anti-RBD inibem a ligação da proteína S a ela. Fonte: (TAYLOR et al., 2021)

Hwang et al (2022), Nathan et al (2021), Olivera-Ugarte et al (2022), entre outros autores, têm defendido que a administração de anticorpos monoclonais como agente terapêutico pode fornecer imunoterapia imediata e passiva, com potencial para reduzir a progressão da doença imediatamente após a administração, e também o potencial para reduzir a gravidade da doença. Esses anticorpos monoclonais são uma nova classe de intervenção antiviral que pode neutralizar o SARS-CoV-2 em pacientes infectados. Anticorpos monoclonais neutralizantes são proteínas recombinantes derivadas de células B, ou desenvolvidos a partir de bibliotecas sintéticas ou imunes com técnicas como por exemplo Phage display. Como se sabe, a molécula de um anticorpo monoclonal é composta por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (HWANG et al., 2022; NATHAN et al., 2021; OLIVERA-UGARTE et al., 2022).

As ligações dissulfeto conectam todas as cadeias para formar um tetrâmero em forma de “Y”. As análises de sequências mediante NGS (Sequenciamento de Nova Geração) de células B de pacientes convalescentes, indivíduos vacinados ou camundongos humanizados permite a identificação de anticorpos da classe IgG com especificidade e afinidade para se ligar à proteína da superfície do vírus e bloquear a entrada do vírus nas células saudáveis (HANSEN et al., 2020; LAU et al., 2021). De acordo com (TAYLOR et al., 2021), durante a infecção viral, os anticorpos podem funcionar impedindo a ligação/fusão do virion com as células-alvo (neutralização), ou opsonizando o virion ou células infectadas para captação fagocítica. O mecanismo de neutralização do anticorpo pode variar, incluindo bloqueio direto da entrada viral, funções efetoras mediadas por anticorpos ou inativação da glicoproteína de entrada viral (WALLS et al., 2019).

Embora as vacinas continuem sendo a melhor estratégia para prevenir o COVID-19, os mAbs podem potencialmente beneficiar certas populações vulneráveis antes ou depois da exposição ao SARS-CoV-2, como pacientes de alto risco não vacinados ou recentemente vacinados. A atividade antiviral observada com o tratamento neutralizante com mAb enfatiza a importância da intervenção precoce para ajudar a combater o impacto devastador que o vírus teve em populações tão vulneráveis e em outros pacientes de alto risco. No entanto, os mAbs são complicados de produzir e podem ser limitados no fornecimento inicial. Além disso, qualquer proteção oferecida seria temporária, e a duração da proteção efetiva ainda precisa ser determinada. As respostas a essas perguntas permitirão o uso mais eficaz desses novos tratamentos potencialmente salvadores de vidas, como discutimos aqui.

Antes da COVID-19, a terapia com plasma de pacientes convalescentes (*convalescent plasma therapy* - CPT) era usada para tratar infecções pelo vírus influenza (HUNG et al., 2011; MAIR-JENKINS et al., 2015), vírus sincicial respiratório (RSV) (GROOTHUIS et al., 1993), vírus Ebola (SAHR et al., 2017), e outros coronavírus (KO et al., 2017; YEH et al., 2005), entre outros. A administração de plasma com títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes está associada a melhores resultados clínicos, no

entanto, os títulos de anticorpos do plasma convalescente diferem consideravelmente como (ZHANG et al., 2005) sinala. Este tipo de terapia pode ser conveniente e adaptável para uso em ambientes com poucos recursos e pode ser implantado rapidamente para combater novos surtos de vírus (Figura 5).

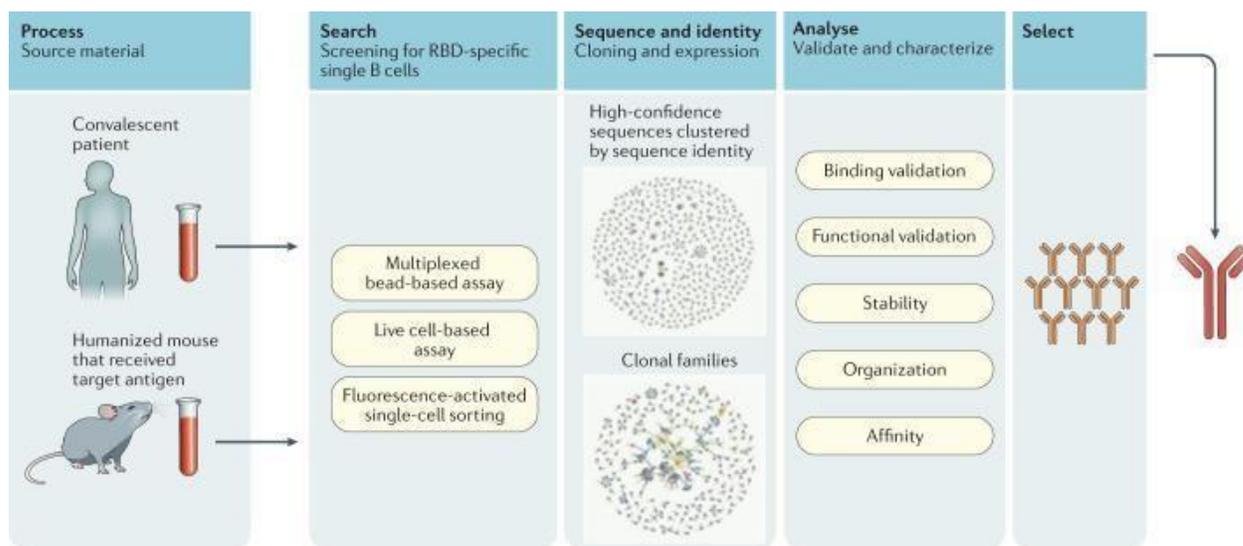


Figura 5. Identificação, seleção e fabricação de anticorpos monoclonais neutralizantes.

Os anticorpos monoclonais neutralizantes (mAbs) usados para tratar a COVID-19 foram feitos de pacientes em recuperação ou camundongos humanizados que haviam sido expostos aos antígenos do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Como agente terapêutico da COVID-19, o anticorpo monoclonal neutralizante funciona visando especificamente o RBD no S do SARS-CoV-2, inibindo assim a interação RBD-ACE2, dando proteção contra a reinfecção com SARS-CoV-2 ou impedindo a progressão da doença. Fonte; (TAYLOR et al., 2021)

Como Wang et al (2022) ressaltam, a falha do RBD em se ligar ao ACE2 resulta na incapacidade do SARS-CoV-2 em entrar nas células vizinhas. Vários anticorpos monoclonais receberam uma autorização em determinados países, a partir de serem reconhecidos nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA), para serem administrados para o tratamento de COVID-19 em populações vulneráveis. A revisão recentemente publicada Widyasari e Kim (2023) resume os principais.

Tabela 1. Identificação, seleção e fabricação de anticorpos monoclonais neutralizantes.

No	Nome do anticorpo	Status atual
1	Bebtelovimab	Permanece autorizado nos EUA até novo aviso do FDA* ambulatórios com COVID-19 de leve a moderada.
2	Tixagevimab com cilgavimab	Permanece autorizado com a recomendação de repetir a dosagem semestralmente com a dose de 300 mg de tixagevimab e 300 mg de cilgavimab.
3	Sotrovimab	Desde 5 de abril de 2022, não é mais autorizado em nenhuma região dos EUA; aprovado na Austrália, no Reino Unido e na UE.
4	Bamlanivimab com etesevimab	Distribuição Pausada.
5	Casirivimab com imdevimab	Atualmente não autorizado em nenhuma região dos EUA; no entanto, recomenda-se que seja mantido para futuras variantes de SARS-CoV-2 que possam ser suscetíveis.
6	Amubarvimab/romlusevimab	Aprovado na China.
7	Regdanvimab (CT-P59)	Aprovado na República da Coreia e na UE.
8	Ronapreve	Aprovado no Japão, Reino Unido, UE e Austrália.
9	F61	Aprovado para ensaios clínicos na China.
10	Sarilumab	Ensaio clínico fase 3.
11	Adalimumab	Ensaio clínico fase 3.
12	Canakinumab	Ensaio clínico fase 3.
13	Ravulizumab	Fase clínica 3 concluída; recrutamento de ensaios de fase 4.

*Abreviação: EUA, autorização de uso emergencial; FDA, Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA. Fonte: Adaptada de (WIDYASARI; KIM, 2023); www.covid19treatmentguidelines.nih.gov.

No geral, os dados mostram que a terapia com anticorpos teve um grande sucesso para neutralizar os VOCs circulantes em momentos determinados da pandemia. A variante britânica conseguiu ser neutralizada pelas vacinas de mRNA (mRNA-1273; Moderna e BNT162b2; Pfizer), com eficácia populacional adequada. Embora os ensaios tenham mostrado uma eficiência de 77% contra esta variante, em comparação com 84% contra a cepa original. A vacina vetorial ChAdOx1 (AstraZeneca) também permaneceu

bem-sucedida contra esta variante. As três vacinas anteriores foram criadas a partir da cepa e sequência genética original de (Wuhan-Hu), que não apresentavam essa mutação, por terem sido as primeiras. Em contraste com os 89% da cepa original, a vacina de subunidade proteica NVX-CoV2373, também conhecida como Novavax, demonstrou uma eficácia de 86% contra esta variante. A vacina vetorial Ad26.COV2. S (Janssen) demonstrou uma eficácia de 57% na proteção contra doenças moderadas/graves, em oposição a 66-72% em países onde a variante sul-africana não circula, embora mantendo 85%. Em comparação com 89% da cepa original, a eficácia da vacina NVX-CoV2373 contra esta variedade sul-africana foi inferior a 50% (COVID Data Tracker, 2023).

Para se adaptar à espécie humana, o SARS-CoV-2 sofreu múltiplas mutações, o que levou ao surgimento de diversas variantes genéticas (deriva antigênica). A maioria delas não acarreta modificações significativas nas características básicas do vírus, mas algumas, por outro lado, apresentam um aumento considerável na letalidade, infecciosidade e transmissão. A preocupação sobre como essas variações podem afetar a eficácia das diversas vacinas cresceu desde o começo da vacinação em massa, dado que a maior parte dessas variantes apresenta alterações altamente específicas que impactam os aminoácidos do receptor celular do vírus, onde as vacinas atuam. Por esta razão, o estudo contínuo e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que possam contrariar a reinfecção por este vírus ou impedir o desenvolvimento desta doença na sua forma mais grave é de vital importância e relevância.

2.4 Metodologias contemporâneas de análise de anticorpos monoclonais.

2.4.1 Citometria de fluxo.

Novas pesquisas sugeriram um método alternativo baseado em citometria de fluxo para testar o vírus SARS-CoV-2. A citometria de fluxo é um método usado em diferentes campos da ciência para analisar células ou partículas individuais, é uma técnica capaz

de detectar múltiplos parâmetros em uma única célula ou em amostras biológicas como soro ou plasma. A tecnologia expõe cada partícula a lasers e mede a dispersão de luz visível resultante, bem como um ou mais parâmetros de fluorescência, tendo a capacidade de analisar células individualizadas ou *beads* (micropartículas ligadas com elementos de interesse, no caso proteínas virais). Os dados coletados na dispersão da luz podem indicar o tamanho da célula, bem como a granularidade e a complexidade interna de uma célula. As amostras são coradas com corantes fluorescentes e anticorpos fluorescentes conjugados que permitem aos cientistas detectar a presença de certos vírus ou anticorpos contra vírus. Como Zattoni et al (2019) entre outros autores afirmam, a citometria de fluxo é uma técnica consolidada no diagnóstico laboratorial, amplamente utilizada como ferramenta com capacidade de triagem em grande escala e elevada confiabilidade.

Pesquisas desenvolvidas por (CHENG et al., 2022; MIYAMOTO et al., 2022) usando soros de indivíduos vacinados e por (AGGARWAL et al., 2021; CAMERONI et al., 2021; HOFFMANN et al., 2022) com anticorpos monoclonais, adquirem especial relevância porque entram no seleto grupo das pesquisas que correlacionaram a ligação baseada em citometria de fluxo e a atividade de neutralização do vírus de indivíduos vacinados ou anticorpos clinicamente aprovados contra a variante Ômicron. A aplicabilidade da metodologia proposta por Schulz et al (2022) permite monitorar a cinética dos títulos de anticorpos séricos contra uma variante atualmente dominante ou emergente de SARS-CoV-2, preocupante como é o Ômicron. Da mesma forma, é possível usar esta metodologia para pré-selecionar anticorpos monoclonais clinicamente aprovados para o tratamento de pacientes infectados com COVID-19.

Wang et al (2020a) realizaram ensaio de inibição de ligação ao receptor baseado também em citometria de fluxo, medindo a interferência do anticorpo da ligação de S1B ao receptor ACE2 humano na superfície celular. O resultado principal desta pesquisa foi descrever o primeiro anticorpo monoclonal humano que neutraliza SARS-CoV-2 (e SARS-CoV) em cultura celular. Esse anticorpo de neutralização cruzada tem como alvo um epítipo comum desses vírus e oferece um tratamento para a COVID-19 (WANG et

al., 2020a). O uso da citometria de fluxo neste sentido, a partir destes resultados, permite identificar anticorpos neutralizantes que podem alterar o curso da infecção no hospedeiro infectado, auxiliando na eliminação do vírus ou protegendo um hospedeiro não infectado que é exposto ao vírus.

Mielke et al (2022) por sua parte, usaram plasma de 50 indivíduos infectados com SARS-CoV-2 e 20 controles saudáveis não-expostos ao SARS-CoV-2 para desenvolver quatro ensaios específicos e reprodutíveis baseados em citometria de fluxo, sendo dois deles encaminhados para avaliar a ligação do anticorpo e degranulação de células NK mediada por anticorpo contra células infectadas com SARS-CoV-2, e outros dois ensaios para avaliar a ligação de anticorpo e degranulação de células NK mediada por anticorpo contra SARS-CoV-2 em células transfectadas com Spike (MIELKE et al., 2022). Os quatro ensaios demonstraram a capacidade de detectar a presença dessas respostas de anticorpos funcionais de maneira específica e reprodutível.

Schulz et al (2022), usando ligação baseada em citometria de fluxo e ensaios de neutralização de SARS-CoV-2 pseudo-tipados, concluíram que uma terceira vacinação com BNT162b2 é eficaz em aumentar a quantidade de anticorpos séricos neutralizantes contra as variantes Delta e Ômicron do SARS-CoV-2, embora em menor grau do que contra a cepa parental de Wuhan (SCHULZ et al., 2022). O artigo também sugere que a maioria dos anticorpos terapêuticos clinicamente aprovados e potentes contra a variante Delta falharam em reconhecer e neutralizar a variante Ômicron, enquanto alguns anticorpos em desenvolvimento pré-clínico potencialmente neutralizam a variante Ômicron. O artigo recomenda o uso de um ensaio de ligação de anticorpo baseado em citometria de fluxo para monitorar rapidamente candidatos terapêuticos e títulos séricos contra variantes emergentes de SARS-CoV-2. No geral, este tipo de proposta permite enfatizar a importância das vacinações de reforço para aumentar os títulos de anticorpos séricos protetores, especialmente no caso da variante Ômicron (SCHULZ et al., 2022).

2.4.2 Mapeamento de epítomos.

Complementando as técnicas de análises de anticorpos monoclonais, a identificação de epítomos reconhecidos é fundamental para entender as bases moleculares das funções biológicas dos anticorpos e distingui-las. Cada anticorpo tem uma propriedade distinta chamada especificidade fina. Conseqüentemente, tanto o uso de anticorpos como ferramentas de pesquisa quanto a engenharia de anticorpos para fins terapêuticos, requerem o uso de métodos de mapeamento de epítomos robustos e simples.

Dita ferramenta, vem chamando a atenção recentemente e se mostra eficiente tanto no diagnóstico quanto no desenvolvimento de vacinas. Várias técnicas foram desenvolvidas com o desejo de fornecer mapeamento preciso de epítomos para uso na concepção de ferramentas de diagnóstico sensíveis e no desenvolvimento de vacinas baseadas em epítomos (EBVs), bem como terapêuticas (CAMERINI et al., 2021; HAMED et al., 2023). A descoberta de epítomos, ou mapeamento, é uma etapa fundamental na percepção da patogênese viral e na descoberta de reagentes de diagnóstico e vacinas baseadas em epítomos (EBVs).

Com base na continuidade sequencial, os epítomos podem ser classificados em epítomos lineares ou contínuos, e conformacionais ou descontínuos. A primeira classificação se refere a segmentos peptídicos lineares compostos por um trecho contínuo de resíduos ao longo da cadeia polimérica, que são tipicamente hélices anfipáticas de 9 a 12 resíduos de aminoácidos. Os epítomos conformacionais, por outra parte, são estruturalmente mais complexos, não lineares e distintos, com extensão de 15 a 22 resíduos de aminoácidos e descontinuidade sequencial, mas com vizinhança espacial. Eles são compostos de numerosos fragmentos sucessivamente descontínuos adicionados pelo dobramento do antígeno em sua estrutura nativa (CAMERINI et al., 2021; HUANG; HONDA, 2006; YANG; YU, 2009). Os epítomos lineares são encontrados principalmente em polissacarídeos, proteínas fibrilares e ácidos nucleicos de fita simples. A reação do anticorpo contra o antígeno depende da estrutura linear ou primária dos

aminoácidos e, na maioria das vezes, eles ficam disponíveis para a reação do anticorpo após a desnaturação da proteína. Por outro lado, epítopos conformacionais são encontrados na maioria das proteínas globulares e ácidos nucléicos nativos e anticorpos reconhecem um epítipo conformacional por sua estrutura tridimensional específica (CRUSE et al., 1999).

Os epítopos são divididos em epítopos de células B e T, com base em seus receptores correspondentes. O reconhecimento de epítopos por estas células varia significativamente. As células B reconhecem antígenos por meio de imunoglobulinas ligadas à membrana chamadas de receptores de células B (BCRs). O sítio de ligação do epítipo chamado parátipo está localizado em cada ponta dos dois fragmentos Fab que compõem o receptor de células B (LUŠTREK et al., 2013). Os epítopos de células B podem ser qualquer região exposta ao solvente no antígeno e podem ser diversos em natureza química, ou seja, podem ser pequenos compostos químicos completos ou componentes de macromoléculas maiores, como proteínas, nucleotídeos, lipídios e glicanos (AHMAD; EWEIDA; SHEWEITA, 2016). No entanto, a maioria dos antígenos são proteínas. Os epítopos de células B podem ser classificados com base em sua potência imunogênica em: imunodominante (aumento de 2 a 3 vezes no nível de anticorpos após a administração da vacina), imunogênico (uma vez) e não imunogênico (zero vezes) (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017).

A identificação de epítopos de células B na proteína SARS-CoV-2 S é essencial para o desenvolvimento de testes diagnósticos e prognósticos eficazes, intervenções terapêuticas e vacinas. Resultados recentes mostraram reconhecimento de epítopos lineares de RBD por anticorpos IgA e IgG em pacientes com COVID-19 com sintomas moderados e leves da doença (HEIDPRIEM et al., 2021).

(WAN et al., 2020) em um amplo estudo desenvolvido onde purificaram mais de 1.000 células B de memória específicas para SARS-CoV-2 S1 ou seu RBD, obtiveram 729 fragmentos de cadeia pesada e leve pareados, entre eles, 178 anticorpos apresentam resultado positivo para ligação ao antígeno. Estes autores identificaram 11 anticorpos

neutralizantes, oito dos quais apresentam IC50 em 10 nM, e o melhor, 414-1, com IC50 de 1,75 nM. Por meio do mapeamento de epítomos, foram achados três epítomos principais em RBD reconhecidos por esses anticorpos, e que o anticorpo epítomo-B 553-15 pode aumentar substancialmente as habilidades de neutralização da maioria dos outros anticorpos.

(HAYNES et al., 2021) discutem a aplicação da *Serum Epitope Repertoire Analysis* (SERA), uma tecnologia de exibição randômica de peptídeos bacterianos que permite a avaliação da soropositividade do SARS-CoV-2 e o mapeamento de alta resolução de epítomos em qualquer proteoma, incluindo SARS-CoV-2, suas cepas mutantes, coronavírus comuns e o proteoma humano. Foram identificadas regiões e motivos de epítomos dominantes que demonstram potencial para classificar a doença leve da grave e se relacionam com a atividade de neutralização. Estes autores destacaram que os epítomos SARS-CoV-2 apresentaram reação cruzada com outros coronavírus e demonstraram diminuição do sinal do epítomo para cepas mutantes de SARS-CoV-2.

O mapeamento também tem sido aplicado para entender o papel que as células T CD4+ e CD8+ desempenham na proteção e na gravidade da doença de COVID-19 por autores como (BOSWELL et al., 2021). Os resultados obtidos sugerem que as células T que têm como alvo S, N e M desempenham um papel importante na resposta imune ao SARS-CoV-2 e devem ser consideradas no futuro desenvolvimento de vacinas.

3 JUSTIFICATIVA.

Desde o começo da pandemia da COVID-19, as variantes de SARS-CoV-2 que substituíram o tipo selvagem tornaram-se as linhagens dominantes de forma global, facilitando tanto sua transmissão como afetando a eficácia protetora das vacinas e terapias baseadas em anticorpos monoclonais (mAbs) aprovadas sob autorização de uso de emergência. Assim, tornam-se pertinentes e necessários os estudos focados na descoberta e o desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos monoclonais neutralizantes (mAbs), tendo como alvo o domínio de ligação ao receptor da glicoproteína (RBD) da proteína Spike (S) do SARS CoV-2. A partir da seleção de anticorpos de uma biblioteca de fagos feita pelo nosso grupo, foram obtidas algumas centenas de mAbs que se ligam ao antígeno alvo. O mapeamento de epítomos, além de ser uma etapa importante e necessária na caracterização de anticorpos que se ligam a um potencial alvo terapêutico, possibilita agrupar esses mAbs em classes que não competem, de modo que um ou dois membros de cada classe podem ser testados quanto à bioatividade. Essa classificação poderia reduzir um pool selecionado de várias centenas de scFvs a algumas dezenas. Em consequência, os resultados deste projeto deverão validar moléculas que poderão ser utilizadas como biofármacos de última geração.

4 OBJETIVOS.

Objetivo geral.

Caracterizar e determinar os epítomos específicos de ligação de anticorpos monoclonais com potencial neutralizante contra o SARS-CoV-2 selecionados por Phage Display.

Objetivos específicos.

1. Produzir, purificar anticorpos no formato scFv contra o SARS-CoV-2.
2. Realizar ensaios de ligação dos scFvs à proteína Spike e suas variantes do SARS- CoV-2 por meio de citometria de fluxo.
3. Identificação de epítomos dos anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2.

5 MÉTODOS

5.1 Extração de RNA de linfócitos de doadores convalescentes.

Após aprovação ética da CONEP (CAE30931820.30000.5558) foi feita uma seleção de candidatos participantes a partir de um questionário disponibilizado no site do Hemocentro. Todos os sujeitos foram informados sobre o estudo a partir da leitura do TCLE (Termo de Consentimento livre e Esclarecido) (Anexo 1). O sangue total (aprox. 8 ml) de candidatos a doação de plasma foi coletado por profissionais qualificados da equipe do projeto no Hospital Universitário (HUB-UnB), de maneira a assegurar a segurança dos doadores. O soro dos doadores que consentiram foi transportado para o LabMIB no NMT-UnB, onde era também feita uma confirmação de positividade para COVID 19 por meio de teste rápido de COVID.

5.2 Produção de fragmentos de anticorpos recombinantes - scFvs.

A partir de uma biblioteca de anticorpos de scFv gerada a partir do RNA de linfócitos de doadores de pacientes convalescentes de COVID-19, e usando o domínio responsável da ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2 como antígeno para selecionar anticorpos que se liguem ao SARS-CoV-2, com potencial de neutralizar a infecção de células pelo vírus, foi feito o *biopanning*. Assim, foram selecionados os anticorpos com afinidade para o antígeno após 4 ciclos de *biopanning*.

Após sequenciamento, análises e identificação das sequências únicas, os genes codificantes dos fragmentos de anticorpos com ligação ao receptor RBD foram amplificados por PCR. Após a amplificação, o produto foi digerido por meio da utilização de enzimas de restrição NdeI e XhoI, que promoveu a liberação dos fragmentos correspondentes aos scFv, e ligadas ao vetor de expressão pET-21a (+). Como cepa hospedeira, as bactérias *Escherichiacoli* XL1 Blue foram usadas com a finalidade de propagar o vetor plasmidial pET-21a (+) ligados a diferentes scFvs. Para a expressão

proteica dos scFvs, foram testadas e utilizadas a bactéria *E.coli* Shuffle® *plys* Y com diferentes tempos de indução de produção.

5.2.1 Sequenciamento Sanger

Amostras de DNA plasmidial purificados foram sequenciados por meio de sequenciamento Sanger, pela empresa Extend, São Paulo, Brasil. A amplificação da região desejada foi realizada usando iniciadores para o promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAG3') e para o promotor Omp-A-F (5'-GGATCATATGAAAAAGACAG-3'). Os resultados foram analisados no editor de alinhamento de sequências BioEdit (versão 7.2).

5.2.2 Identificação das sequências únicas.

Foi realizada a análise da diversidade gênica dos grupos de VH e de VL mais enriquecidos nas seleções, em relação às suas respectivas sequências germinais, pela definição do grau identidade obtida por meio do alinhamento das sequências no banco de sequências de imunoglobulinas, Ig BLAST. Foi analisada a variação da frequência dos domínios variáveis da cadeia pesada (VH) e leve (VL) entre o último ciclo de seleção (ciclo 4) e a biblioteca antes da seleção do Phage Display.

5.2.3 Desenho de genes.

A partir das sequências de domínios variáveis das cadeias pesada e leve mais enriquecidos ao longo do processo de seleção por Phage Display, fragmentos de anticorpos de cadeia única, scFv humanos foram desenhados e a combinação dos VH com os VL foi realizada com base no enriquecimento da seleção. As sequências recombinantes foram elaboradas com o uso de códons preferenciais da linhagem B de *E. coli* e com o uso de sequências (tags): cauda poli- histidina (sequência de seis histidinas na porção C-terminal).

Os fragmentos de DNA codificando os anticorpos foram clonados no vetor de expressão heteróloga pET-21a, plasmídeo utilizado para a expressão heteróloga de proteínas em bactérias. Ele contém uma região de clonagem múltipla com sítios para enzimas de restrição, o promotor T7 para transcrição induzida por IPTG e um gene de resistência a ampicilina para seleção de bactérias transformantes. Esse plasmídeo é compatível com a linhagem Shuffle® *plys* Y ou outras cepas de *E. coli* compatíveis com o promotor T7, como a linhagem BL21 (DE3) por exemplo. Após a clonagem, os vetores de expressão heteróloga foram multiplicados em larga escala e obtidos por Minipreparação de extração de DNA plasmidial.

5.2.4 Clonagem no vetor pET21a. Transformação e seleção de clones.

Para a amplificação do inserto foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores pCOMB3XTT-OmpA-F e pCOMB3XTT-HA-R. A sequência destes oligonucleotídeos está descrita na Tabela 2. As reações de PCR foram feitas com enzima Phusion™ DNA polimerase. As ciclagens consistiram de um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, e na fase de anelamento foram testadas 8 temperaturas, um gradiente de 65°C a 50°C por 20 segundos e 72°C por 1 minuto, terminando com um ciclo de 72°C por 10 minutos para a finalização da extensão. Também foi preparado um controle negativo consistente na reação de ligação sem inserto.

Tabela 2. Sequência de primers para clonagem dos scFvs no pET-21a.

Primers	Seqüencia 5'-3'
pCOMB3XTT-OmpA-F	GGATCATATGAAAAGACAGCTATCGCGATTG
pCOMB3XTT-HA-R	ATATCTCGAGTTAAGCGTAGTCCGGAACGGTCGTAC

O vetor pET21a (Figura 6) contém uma região promotora T7 para a expressão induzível por IPTG, bem como um marcador de seleção para ampicilina. O gene de interesse, neste caso o scFv, foi clonado no vetor entre os sítios de restrição NdeI e XhoI, permitindo a expressão da proteína recombinante com uma cauda de histidina na extremidade C-terminal para purificação posterior por cromatografia de afinidade por íons de níquel.

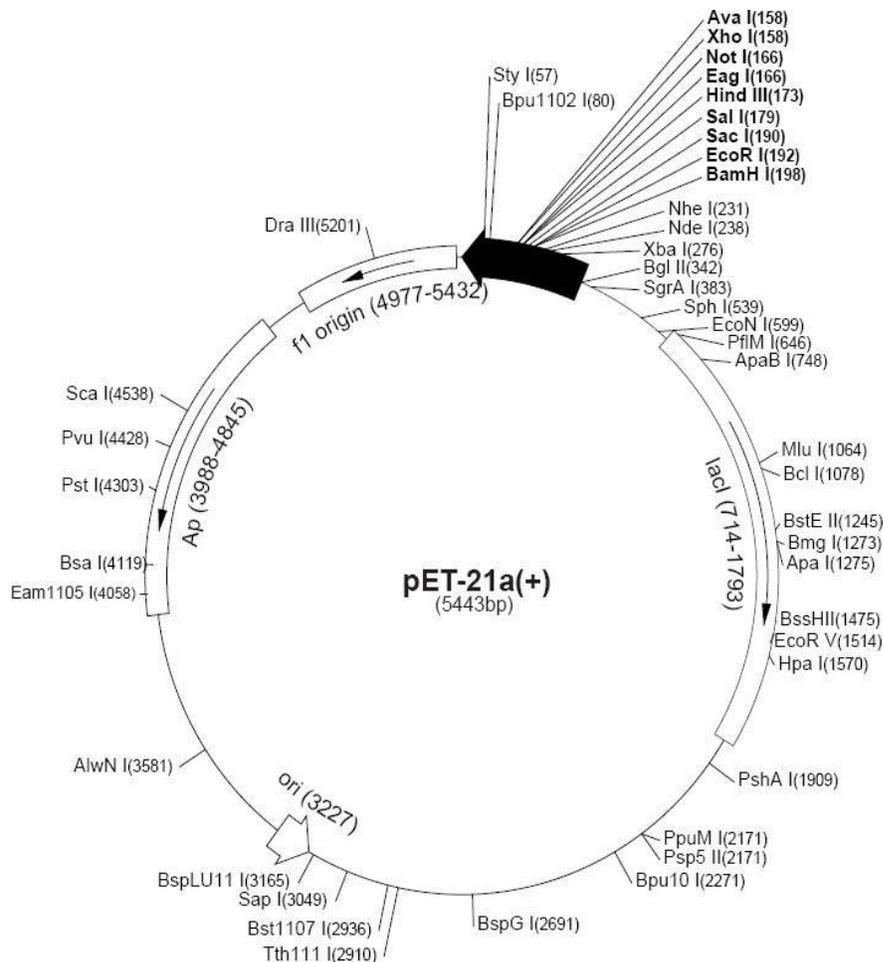


Figura 6. Vetor pET-21a. Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor.

Para a clonagem, uma colônia isolada da bactéria *E. coli* XL1 Blue foi inoculada em 10 ml de meio SB contendo o antibiótico tetraciclina. Esse pré-inóculo foi mantido a 37 °C sob agitação de 220 rpm por 16 horas. foi inoculado 1 ml do pré-inóculo em 500 ml de

meio SB (Peptona de Case.na 3,000% (p/v) Extrato de Levedura 2,000% (p/v) MOPS 1,000% (p/v) pH 7,0) e incubado a 37 °C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD600) de 0,7 a 0,9. O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e as células foram mantidas sempre geladas a partir desse momento. O sedimento foi ressuscitado em 25 ml de glicerol 10% estéril gelado e a seguir foram adicionados mais 75 ml de glicerol 10% gelado. Posteriormente foi feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, repetindo a etapa anterior. O sedimento ressuscitado em 25 ml de glicerol 10% estéril gelado foi submetido à última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C.

Para a transformação, 2 µL dos sistemas de ligação foram adicionados, já em um tubo previamente resfriado, com às células competentes e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioAgency®). A eletroporação dos plasmídeos foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. Imediatamente após o choque, a cubeta foi lavada com 3 ml de meio SOC (Meio SOB 98 ml Solução estoque de Mg²⁺ 2 M 1 ml Solução estoque de glicose 2 M 1 ml) e o meio foi colhido. Após incubação de 1 h a 37 °C e 220 rpm, diluições da transformação foram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 µg/ml. As placas foram mantidas incubadas a 37 °C por 16 horas para seleção de colônias transformadas.

A eficiência da ligação e transformação foi vista nas colônias crescidas nas placas das amostras e do controle negativo. Placas com colônias foram consideradas como sendo as células que foram transformadas com o inserto ligado ao vetor. Colônias escolhidas aleatoriamente foram crescidas em meio LB (Peptona bacteriológica 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) para extração de DNA plasmidial (Miniprep) o qual foi submetido, posteriormente, a uma análise por digestão enzimática usando as enzimas Xho I e Nde I (New England Biolabs) para confirmação da clonagem. 500 ng de DNA plasmidial foram incubados com 10 ou 20 U de enzima de restrição em tampão adequado

(New England Biolabs Inc.), em volume final de 20 μ L, por 2 a 4h a 37°C.

Em seguida, estas digestões foram analisadas em gel de agarose. A agarose foi preparada numa concentração de 1,0% em tampão TAE 1X com 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram aplicadas com tampão de amostra para gel de agarose no gel e submetidas à eletroforese em tampão TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização e digitalização das imagens foi utilizado o fotodocumentador Biorad Chemidoc XRS+.

Após análise e confirmação da ligação das sequências dos fragmentos de anticorpos no vetor de expressão pET-21a (+), as bactérias *E. coli* XI1 Blue com os genes alvos inseridos nos plasmídeos foram cultivadas em placas de meio LB por um período de 16h. Com o intuito de selecionar colônias isoladas para amplificação dos DNAs de interesse por minipreparação comercial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit, da QIAGEN, seguindo instruções do fabricante.

Seguido a o procedimento de miniprep, os DNAs extraídos e purificados foram inseridos em bactérias *E. coli* SHuffle® *plys* Y da New England BioLabs, por meio de choque térmico-CaCl₂.

Foram inoculados 500 μ L de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada de cada uma das bactérias de nosso interesse, células SHuffle® *plys* Y, em 50 ml de meio LB. O inóculo foi incubado a 37°C a 250 rpm até a cultura atingir uma (OD600) de 0,1 a 0,3. O inóculo foi centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4 °C. Em todas as etapas subsequentes as células foram mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência. O sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de solução de CaCl₂ 50 mM estéril gelada, com movimentos suaves, posteriormente foi sujeito a centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante era descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de solução de CaCl₂ 50 mM estéril gelada, com movimentos suaves e, então, mantido em banho água/gelo por 1 hora, para tornar as células competentes. Na transformação, foram usados 3 μ L contendo 300 ng de

vetor de expressão pET-21a (+) carregando os genes codificantes dos scFv sintetizados de cada um dos DNAs Plasmidiais extraídos por miniprep, e misturados com 100 µL de bactérias *E. coli* XL1 Blue competentes, foram incubadas, no gelo por 45 min. O sistema foi submetido ao choque térmico, de 42 °C por 3 min, e, imediatamente depois, 1 ml de meio SOC foi adicionado. As células transformadas foram incubadas a 250 rpm e 37°C, por 1,5 h, e em seguida, semeadas em meio 2xYT ágar (Peptona bacteriológica 1,6%, Extrato de Levedura 1,0%, NaCl 0,5%, Ágar 1,5%, pH 7,0), contendo diferentes concentrações de ampicilina (100 µg/ml, 75 µg/ml e 50 µg/ml), para crescerem a 37 °C, durante à noite.

Após purificação, ligação, transformação e preparação plasmidial dos clones obtidos foram analisados quanto ao seu perfil de restrição com as endonucleases Nde I e Xho I. Após o período de incubação, os transformantes selecionados haviam crescido mais isoladamente nas placas contendo 100 µg/ml do antibiótico. Para controle, o procedimento foi realizado como descrito acima, mas com água ao invés de bactérias competentes.

5.2.5 Expressão heteróloga de anticorpos scFvs recombinantes.

Colônias isoladas das baterias SHuffle® *p/lys* Y foram inoculadas em 5 ml de meio TB (2,4% de extrato de levedura; 2,0% de peptona bacteriológica; 0,4% de glicerol; 17 mM de KH₂PO₄; 72 mM de KH₂PO₄) com glicose 1%, Ampicilina 10 µg/ml, e cultivadas a 250 rpm e 37 °C, durante à noite. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas a 3500 x g por 15 minutos e, em seguida, os pellets formados foram ressuspensos em 9 ml de meio TB (1.2% triptona, 2.4% extrato de levedura, 0.5% glicerol). Cada cultura foi então transferida para um Erlenmeyer contendo 81 ml de meio TB e 10 ml de tampão fosfato (0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M KH₂PO₄) (totalizando 90 ml de TB e 10ml de tampão) e colocada em uma incubadora com agitação 200 rpm a 37 °C por 6 horas para que pudesse alcançar a densidade óptica desejada de 2,0. Atingida a densidade desejada, a cultura foi centrifugada a 3000 xg à temperatura ambiente, por 20 min, e o sedimento de células foi

ressuspendido com 200 ml de meio TB contendo IPTG 1 mM. A expressão heteróloga dos anticorpos recombinantes foi induzida a 200 rpm e 25° C, por 4, 8 e 16 horas. Após essa incubação, a cultura de células foi centrifugada a 9000 xg 4 ° C por 15 min.

O sedimento de células, após a indução da expressão heteróloga, foi ressuspendido com 20 ml de tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 40 mM; NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM) e submetido a sonicação no processador ultra-sônico Q700 (QSONICA, Newtown, Connecticut, EUA). Foram realizados 2 ciclos de sonicação, com intervalos de 12 min entre eles. Em cada ciclo de seleção, a mistura de células foi sonicada, a uma amplitude de 50, por 10 pulsos de 15 segundos, com intervalos de 1 minuto. Durante todo o processo de sonicação, as células foram mantidas no gelo, para evitar superaquecimento. Ao final, a fração solúvel (sobrenadante) foi separada da fração insolúvel (sedimento) por meio de centrifugação a 14000 x g e 4 °C, por 2 horas.

5.3 Purificação de fragmentos de anticorpos recombinantes - scFvs.

Os fragmentos de anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade pelo método gravitacional em resina Ni-NTA, e dessalinizados, biotinilados, concentrados e quantificados por espectrofotometria. Para a purificação, os sobrenadantes foram primeiro filtrados em filtros de seringa estéreis PES 0,22 µm. (MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, EUA, cat: SLFG025LS). As colunas foram previamente equilibradas com 2,5 ml de Tampão de Ligação (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM). Os filtrados foram então incubados com 100 µL de resina HisPur Nickel da Thermo Scientific, por 30 minutos, a temperatura ambiente e em rotação de 25 rpm. As colunas Ni-NTA spin (QIAGEN) foram equilibradas previamente com 600 µL de tampão de ligação (NaH₂PO₄ 40 mM, NaCl 0,5 M) contendo Imidazol 10 mM pH 7,4 (Sigma-Aldrich). O sistema foi centrifugado a 700 x g e 4 °C por 2 min, a fim dos sobrenadantes passarem por completo pelas colunas. A resina da coluna foi lavada 3 vezes com 700 µL de tampão de ligação com Imidazol 50 mM, por centrifugação a 890 x g e 4°C por 2 min. E as proteínas de interesse foram eluídas 3 vezes com 500 µL de tampão de eluição (NaH₂PO₄ 40 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM), por centrifugação a 900 x g e 4 °C por 2 min. Foram utilizadas 3 colunas para cada amostra de fração solúvel para evitar saturação da resina da coluna, e, ao final, as frações eluídas das colunas da mesma amostra foram juntadas. Após a purificação, o tampão foi substituído por PBS ((solução salina tamponada com fosfato; NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4) (e as proteínas foram concentradas para 300 µL em filtro Amicon Ultra, 30 kDa (Ultracell. MerckMillipore). As proteínas foram então quantificadas utilizando o NanoDrop 2000 e armazenadas a 4°C até sua utilização nos ensaios. Em cada etapa, foram recolhidas alíquotas para posterior análise por Dot-Blot e análises de pureza por SDS-PAGE e Western-Blot.

5.4 Dot-Blot (DB) para a detecção de anticorpos.

Para validar a produção das proteínas recombinantes, foi realizado um ensaio de Dot-Blot. Primeiramente uma membrana de PVDF foi ativada com metanol, por 30 segundos, e depois foi acrescentado água por 1 minuto e tampão de transferência por mais 1 minuto para parar a hidratação da membrana. 10 µL da proteína purificada foram adicionados

em uma membrana que, depois de seca, foi bloqueada com leite em pó desnatado diluído para 5% em PBS por 1 h, em temperatura de 37°C, sob agitação. Na sequência, a membrana foi lavada por 3 vezes, utilizando PBS- T 0,05% (PBS com Tween-20 a 0,05%) e mantendo-a sob agitação por 5 minutos. Após as lavagens, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-Histag conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich-A5588), diluído 1:2000 em PBS e incubado por 1h em temperatura de 37°C, sob agitação. A seguir, após a membrana ser novamente lavada conforme descrito, foi adicionado substrato NBT/BCIP (Roche, Basileia, cat: 11681451001) e novamente incubado em temperatura ambiente, sob agitação, por tempo suficiente para a verificação do resultado visualmente (aproximadamente 15 minutos).

5.5 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante.

A eletroforese unidimensional em gel SDS- PAGE (SDS- PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) em condições desnaturantes e redutoras foi utilizada para determinar a massa molecular dos scFvs recombinantes após as etapas de purificação. As amostras foram incubadas a 100 graus centígrados por 10 min em tampão de amostra 1X (Tris-HCl 100mM pH 6,8; SDS2%; β mercaptoetanol 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) em banho maria.

Foram preparados dois géis SDS- PAGE, em concentrações de (Concentrador 6% e separador 12%) e corrida realizada em voltagem de 120 V por 2 h. Um dos géis foi corado com solução Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) composto por 0,25%; metanol 30%; ácido acético glacial 7% por 5h a temperatura ambiente e em seguida, descorado com solução descorante (Metanol 30%; ácido acético glacial 7%) por mais 4 horas. Com os géis totalmente descorados, estes foram levados a um fotodocumentador (BioRad) para análise de suas bandas. Para estimativa da massa molecular das proteínas, foi utilizado o marcador de massa molecular (ThermoFisher Ref: 26616). O outro gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para análises por Western-Blot.

5.6 Western-Blot: imunodeteção de proteínas.

Proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, Reino Unido, cat: GE10600015) em tampão de transferência 1X (Tris base 0,58%, Glicina-HCl 0,29%, SDS 0,037%, Metanol 20%, pH 8,3). A transferência ocorreu no sistema semi úmido Multiphor II (Amersham, Reino Unido, cat: GE18101806) em amperagem constante de 150 mA e voltagem máxima de 10V por 45 min. Depois, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% em PBS-T (NaCl 150 mM, NaHPO₄ 10 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4), temperatura ambiente e em agitação, durante uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T 0,05%. Após as lavagens, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-Histag conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich-A5588), diluído 1:2000 em PBS e incubado por 1h em temperatura de 37°C, sob agitação. A seguir, após a membrana ser novamente lavada conforme descrito, foi adicionado substrato NBT/BCIP e novamente incubado em temperatura ambiente, sob agitação, por tempo suficiente para a verificação do resultado visualmente, os resultados foram registrados no fotodocumentador (BioRad) foi comparado ao padrão: marcador de massa molecular (ThermoFischer Ref: 26616).

5.7 Quantificação dos anticorpos recombinantes.

As frações de anticorpos purificados foram dessalinizadas com filtros de centrifugação Amicon Ultra-2 30 kDa (MerckMillipore) por diluição delas em PBS e posterior centrifugação a 7500 x g, 4°C por 10 min. Os anticorpos purificados e limpos foram quantificados por meio de espectrofotometria usando o NanoDrop utilizando a medida de absorbância a 280 nm.

5.8 Conjugação dos anticorpos recombinantes à biotina.

De acordo com as instruções do fabricante, os scFvs recombinantes expressando a proteína foram ligados à biotina usando um kit comercial (Sigma-Aldrich® H1779) para permitir a realização de vários experimentos. O cálculo não manual foi usado para determinar a quantidade de proteína que seria conjugada com um excesso molar de 20 vezes de biotina. A biotina foi então retirada do refrigerador, deixada aclimatar à temperatura ambiente e dissolvida a uma concentração de 10 mM em DMSO anidro. Os anticorpos recombinantes foram então misturados com a solução reagente de biotina e deixada em repouso a 4°C durante a noite. A biotina extra que não reagiu com a proteína foi então retirada por diafiltração com um filtro Amicon® Ultra, 25 kDa, e a proteína recombinante biotilada foi mantida a 4°C para experimentos posteriores.

5.9 Ensaio de ligação do scFv à proteína Spike e variantes do SARS-CoV-2 por Citometria de Fluxo.

O ensaio de ligação dos scFvs à proteína Spike do SARS-CoV-2 foi medido por citometria de fluxo. Foram usadas células embrionárias de rim humano (HEK 293 F). As células HEK 293 F foram transfectadas com vetores lentivirais das variantes da mutação (D1614G), e variantes Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ômicron (BA.1) e sublinhagens (Ômicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5¹¹), com reagente FreeStyle MAX (Gibco) seguindo as instruções do fabricante. Ditas células foram mantidas por 2 dias a 37°C e 8% de CO₂ a 125 rpm, permitindo a expressão da proteína S na superfície da célula.

As células foram re-suspensas e passadas pela peneira de células Cell Strainer. Posteriormente, as células foram contadas na câmara de Neubauer e 8 x 10⁶ células de cada uma das linhagens usadas para os experimentos.

¹ Comparações estruturais das proteínas spike, mostraram que BA.2.12.1, BA.4 e BA.5 (BA.4 e BA.5 são conhecidos coletivamente como BA.4/BA.5) (CAO et al., 2022).

Foi ajustada a densidade das células para 1×10^7 /ml, diluídas em 100 μ L de solução de bloqueio (BSA 0,5%, PBS, Soro Fetal Bovino 1%). Cada um dos mAbs em concentração final de 2 μ g/ml e marcados com Alexa Fluor 647 carboxylic acid (Invitrogen) Número do catálogo: A 20006, seguindo as instruções do fabricante, foram incubados com as células por 1h a 37°C. Após a incubação das células, foram feitas três lavagens adicionando 1 ml de PBS e centrifugado 5 min a 300 x g. Foi re-suspendido o pellet em 1 ml de PBS contendo o fluorocromo DAPI em concentração final de 1 μ g/ml. Nos controles sem DAPI, foi adicionado apenas PBS. As amostras foram mantidas em gelo e protegidas da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. Para este experimento, foram feitos 14 controles descritos a seguir na tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos controles para o ensaio de ligação dos anticorpos às diferentes variantes por citometria de fluxo.

Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6, correspondem aos anticorpos marcados (3-3, 3-83, 4-4, 4-27, 4-34, 4-36). Os símbolos positivos (+) e negativo (-) correspondem à presença ou ausência da condição experimental específica para esse tubo.

# Tubo	Célula	scFv-AF647	DAPI	Interpretação
1	293F	-	-	Controle não-corado. Controle para a citometria.
2	293F	-	+	Single-color controle de DAPI da citometria
3	293 F (D614G) +1	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não
4	293 F (DELTA) +2	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não
5	293 F (B1.1) +3	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não
6	293 F (D614G) +4	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não

7	293 F (DELTA) +5	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não
8	293 F (B1.1) +6	-	+	Para saber se as células transfectadas estão vivas ou não
9	293 F (D614G) +1	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria
10	293 F (DELTA) +2	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria
11	293 F (B1.1) +3	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria
12	293 F (D614G) +4	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria
13	293 F (DELTA) +5	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria
14	293 F (B1.1) +6	+	-	Single-color controle de Alexa 647 da citometria

Tabela 4. Desenho experimental para o ensaio de ligação dos anticorpos às diferentes variantes por citometria de fluxo.

# Tubo	Testes de ligação dos scFv ao Spike na superfície celular	scFv-AF647	DAPI	Interpretação
15-20	293 F	3-3, 3-83, 4-4, 4-87, 4-34, 4-36	+	Controle negativo do experimento abaixo
21-26	293 F (D614G, DELTA, B1.1) + scFv	3-3, 3-83, 4-4, 4-27, 4-34, 4-36	+	Ensaio de ligação dos anticorpos scFv ao Spike as diferentes variantes

5.10 Mapeamento de epítomos.

O ensaio de *immunoblotting* por Dot-Blot foi usado para determinar os epítomos reconhecidos pelos mAbs. O perfil de resposta dos anticorpos foi realizado com um conjunto de peptídeos [NR-52402 Peptide Array, SARS-Related Coronavirus 2 Spike (S) Glycoprotein (Peptides and Peptide Arrays)]. A matriz de 181 peptídeos abrange a glicoproteína Spike (S) da cepa USA-WA1/2020 de Coronavírus 2 relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2; GenPept: QHO60594). Os peptídeos têm 17 ou 13 resíduos de aminoácidos cada, com sobreposições de 10 aminoácidos, e foram inoculados em membranas de nitrocelulose (NC) (Pierce, EUA). Após a secagem, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado a 4°C durante duas horas. Após seis lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com os diferentes anticorpos recombinantes biotinilados em diluição 1:5000 a 37°C por 1h. Estreptavidina conjugada com HRP foi usada para detecção em diluição de 1:1000 em PBS-T. A ligação foi detetada e visualizada por quimiluminescência usando como controle negativo as sequências de epítomos que não pertencem à proteína Spike. O ensaio foi feito em duplicata. O controle negativo foi um peptídeo que não fazia parte da sequência peptídica do RBD (peptídeo 80). Como controle positivo foi usado BSA biotinilado, para avaliar a especificidade e validação do teste. Para a análise de intensidade de ligação de cada um dos anticorpos aos peptídeos correspondentes às sequências da proteína Spike em tons de cinza, foi usado o software Image J 1.53t (Wayne Rasband and contributors. National Institute of Health, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração de RNA de linfócitos de doadores convalescentes

452 pessoas completaram o formulário de seleção, sendo escolhidos 180 participantes, e 83 finalmente compareceram ao momento da entrevista. O ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para detecção de anticorpos contra a proteína Spike do vírus SARS-CoV-2 em amostras de soro de doadores convalescentes de COVID19 foi realizado utilizando o kit da EUROIMMUN: Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG), seguindo instruções do manual.

Três soros pré-pandêmicos também foram testados como controles negativos. Como descritivos deste primeiro momento de resultados é possível dizer que a razão média entre sinal positivo e o controle do ELISA médio foi de 3,867346154, sendo determinado o início da margem positiva em 1,13 (Figura 7). O período de análise foi de maio a junho de 2020. 79 amostras foram coletadas, 65 com sinal positivo, 61 com RNA suficiente após extração (Anexo 2).

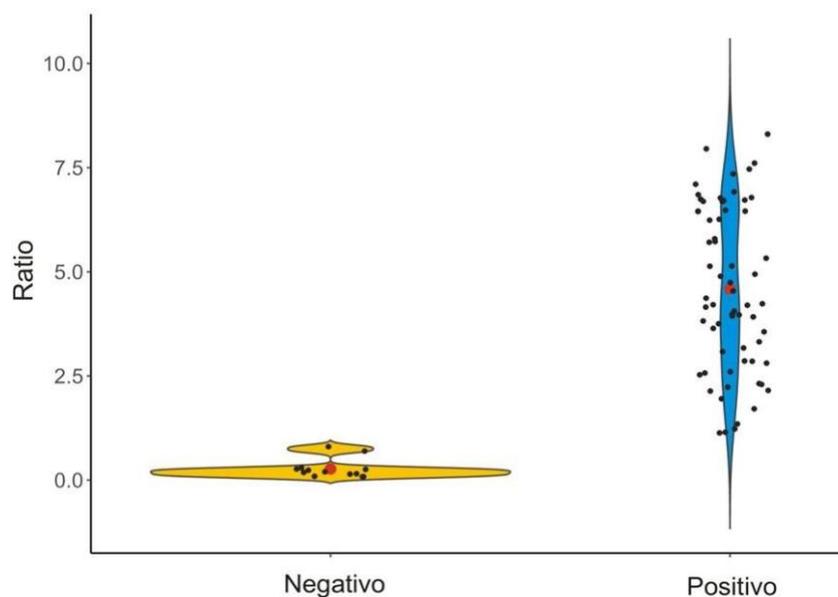


Figura 7. Valores de razão média entre sinal positivo.

Probabilidade de densidade de Kernel (95%). Resultado do teste de ELISA de anticorpos contra SARS-Cov-2.

Para geração da biblioteca de Phage Display, partindo RNAs das 61 amostras com sinal positivo para anticorpos contra a proteína S do SARS-CoV-2, os domínios variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL) dos anticorpos foram amplificados por RT-PCR, utilizando um conjunto de 74 pares de oligonucleotídeos iniciadores, desenhados para capturar o repertório de sequências de imunoglobulinas humanas.

Os domínios de VH e VL (VKappa) amplificados por RT-PCR foram purificados e unidos para gerar os fragmentos de anticorpo scFv por uma série de etapas de PCR de sobreposição. Os scFvs gerados foram digeridos com a enzima de restrição SfiI para clonagem no vetor pComb3XTT digerido também com a mesma enzima. Em total 10 microgramas de scFvs digeridos e purificados foram ligados.

Em seguida foi feita a transformação das ligações (scFvs- pComb3XTT) em *E. coli* SS320 (Lucigen) supercompetentes, e infetadas com fago *helper* para síntese da biblioteca de fagos. Foram obtidos um total de 1.5×10^9 transformantes para fazer a seleção por Phage Display de anticorpos de alta afinidade para o antígeno RBD do SARS-CoV-2.

6.2 Produção e purificação

A seleção foi realizada imobilizando o alvo, que é a molécula de *receptor-binding domain* (RBD) da proteína Spike do vírus da SARS-Cov-2. Após 04 ciclos de seleção e amplificação. A cada ciclo, a adstringência da seleção foi aumentada aumentando o número de lavagens utilizadas para eliminar anticorpos não ligantes foi usada uma solução ácida, a solução ácida de glicina-HCl 0,1 M pH 2,2 foi empregada para fazer a interação anticorpo-antígeno mas restrita, e diminuindo a cada ciclo a concentração do antígeno (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 2,5 µg/ml na placa - para fazer a seleção mais restrita ainda - conseguindo uma maior competição dos fagos ao antígeno, obtendo como resultado final de cada ciclo, fagos mais afins e específicos ao epitopo (Tabela 5).

A partir da seleção de clones em placas deep well foi feita uma (ELISA) de fagos de

clones ligados ao RBD para constatar que a seleção foi exitosa, onde as saídas amplificadas foram testadas separadamente para medir sua afinidade ao alvo. Este teste de ELISA teve como antígeno o RBD, e o BSA como controle para detetar um falso positivo.

Tabela 5. Esquema de adstringência de seleção por Phage Display.

Ciclo	Número de lavagens	Concentração de antígeno	Input	Output
1	5	10 µg/ml	1,90x 10 ¹²	4,28 x 10 ⁶
2	10	5 µg/ml	1,57x 10 ¹²	1,80 x 10 ⁵
3	15	2,5 µg/ml	8,75x 10 ¹¹	1,46x 10 ⁷
4	15	2,5 µg/ml	1,50 x 10 ¹¹	7,8 x 10 ⁶

Para confirmar esses resultados foram testados clones de cada uma das rodadas de seleção (1, 2, 3 e 4). Com o avanço dos ciclos, foi possível observar um maior enriquecimento dos fagos específicos e afins para o antígeno RBD. Foram testados 96 clones por rodada totalizando 384 clones testados por ELISA de fagos para identificar clones positivos, e foram enviados para sequenciamento Sanger.

Após o ELISA de Fagos, foram feitas ELISAS de fagos de clones para confirmar os resultados, e realizados testes de colônias das rodadas 1, 2 e 3. Observando-se que da rodada 1 não se obteve clones positivos (24 colônias), da rodada 2 só 1 foi positiva (9 colônias). Da rodada 3 foram obtidas 11 colônias positivas de 14. Um resultado interessante é que desde a rodada 3 já foi obtido um grande enriquecimento das sequências ligadas ao alvo. Foi feita, então, uma seleção de clones das rodadas 3 e 4, definindo que os clones das rodadas 3 e 4 foram identificados por números começando por 3 e 4, respectivamente.

Após sequenciamento e análise das sequências, foram identificadas 27 combinações de VL com VH que são identificadas como únicas. Estas sequências foram divididas em 5 grupos com base em suas sequências de aminoácidos e similaridade estrutural. Para a amplificação dos scFvs por PCR, os oligonucleotídeos reversos utilizados foram

huScFv-pET21a-R para os clones do cluster 1 ao 5 (Tabela 6). O outro oligonucleotídeo utilizado para amplificar todos os clones foi o OmpA-F.

Tabela 6. Sequência dos primers reversos para amplificação dos scFvs.

Primers	Sequência (5'-3')
huScFv-pET21a-R CL1:3	ATATCTCGAGACCYGAGGAGACGGTGACCGTGGTC
huScFv-pET21a-R CL4	ATATCTCGAGACCYGAAGAGACGGTGACCGTGGTC
huScFv-pET21a-R CL5	ATATCTCGAGACCCGAGGAGACGGTGACCAGGGTG
OmpA-F	GGATCATATGAAAAAGACAG

Assim, 27 clones dos 5 grupos foram amplificados por PCR utilizando a temperatura de anelamento de 67°C (Figura 8). Os 5 grupos são 5 sequências de VH diferentes, derivadas de 2 famílias, a *Immunoglobulin heavy chain variable region* - IGHV 3-53 e a IGHV 3-66, com 3 sequências de regiões de complementaridade (*Complementary determine region* - CDR) 1, 2 e 3 respectivamente, contendo no total 6 sequências diferentes para os CDRs. As sequências CDR são imprescindíveis para outorgar alta afinidade e especificidade dos anticorpos para se ligar aos alvos. Esses 5 grupos com 5 sequências diferentes de VH do anticorpo estão combinadas com 8 famílias diferentes de VL, com poucas mudanças em seus diferentes tipos de CDR. Resumindo, 5 famílias VHs estão combinadas com 8 famílias com VLs diferentes. Assim, foram selecionados para produção 27 anticorpos, codificados na Tabela 7.

Tabela 7. scFv selecionados por Phage Display para produção e purificação.

# Cluster	27 Melhores Clones									
Cluster 1	4-80	4-14	3-84	4-4	3-72	4-67	4-36	4-47	4-15	4-41
Cluster 2	4-5	4-40	3-73	3-71						
Cluster 3	4-23	4-34	4-27	3-86	4-10	4-37				
Cluster 4	4-20	4-87	3-3	3-64	3-83	3-95				
Cluster 5	4-35									

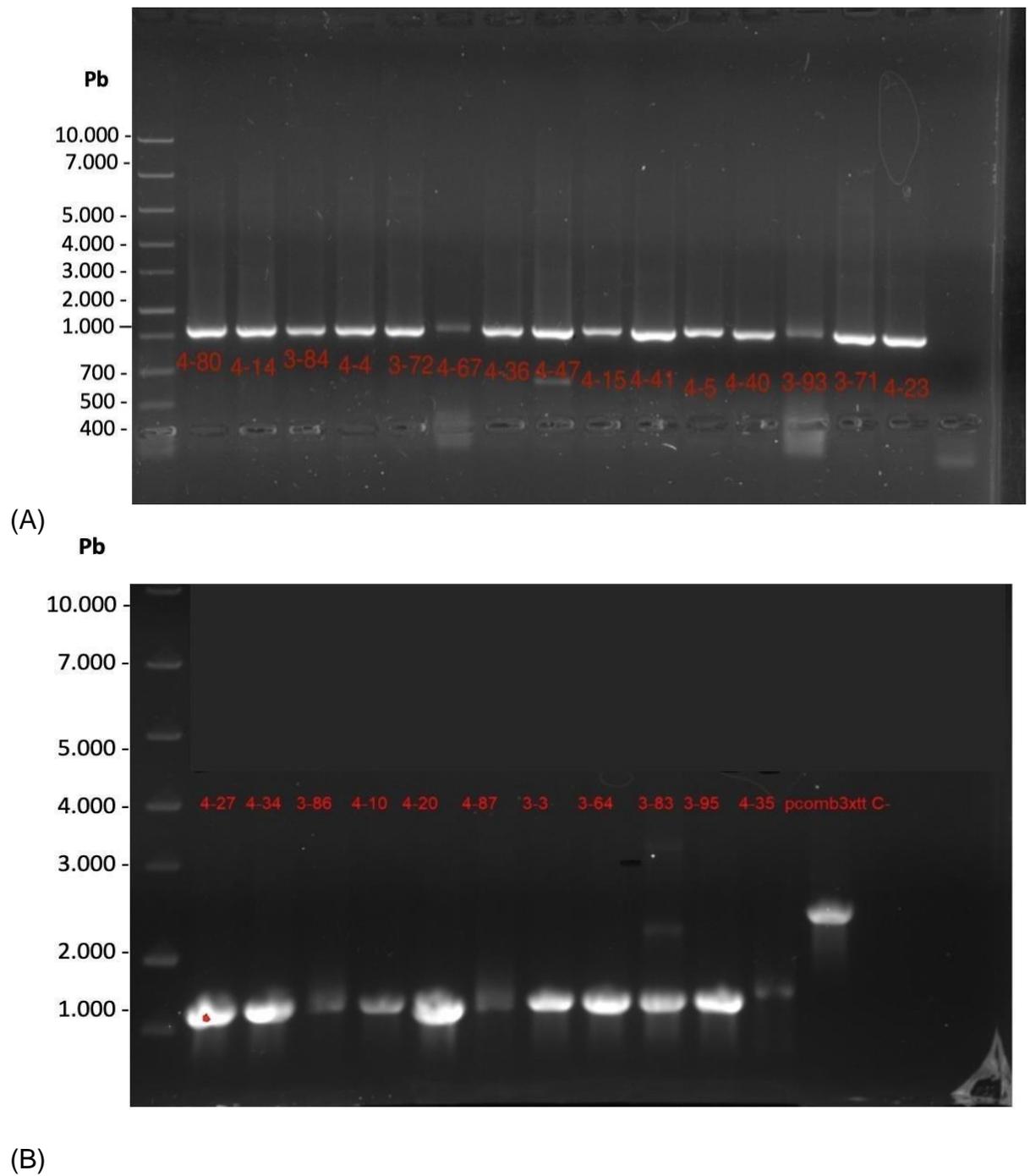


Figura 8. Gel de agarose 1% dos clones amplificados.

Clones na altura aproximada de 800 e 850 pb, correspondente ao tamanho dos fragmentos de anticorpos scFvs e o vetor pCOMB3XTT. (A) Clusters 1, 2 e 3. (B) Clusters 3, 4 e 5. Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (cellco).

Os experimentos de produção do painel de anticorpos selecionados a partir da biblioteca de anticorpos de scFv gerada a partir do RNA de linfócitos de doadores convalescentes² foram realizados usando o sistema de expressão heteróloga bacteriano. Das 27 sequências, 21 foram clonadas no vetor pET-21a. O vetor pET-21a utiliza o promotor T7, que é um dos promotores mais fortes disponíveis para a expressão em bactérias. Isto permite uma alta produção de proteína recombinante, incluindo anticorpos, uma vez que a expressão do gene é induzida. É importante ressaltar também que o pET-21a possui um sítio de ligação para o ribossomo Shine-Dalgarno, que garante uma tradução eficiente da proteína recombinante. Seu sistema de expressão induzível é controlado pela adição de IPTG (isopropil- β -D-1- tiogalactopiranosídeo). Permite controlar o momento em que se deseja iniciar a expressão dos anticorpos recombinantes, o que é útil para otimizar a produção e evitar a toxicidade celular associada à expressão contínua de proteínas recombinantes. Além disso, o vetor pET-21a contém sequências de ligação de etiqueta que permitiu a purificação da proteína recombinante utilizando técnicas de afinidade em resina Ni-NTA. Em nosso caso foi adicionado, uma sequência de ligação de cauda de histidina (His-tag) no C-terminal do anticorpo recombinante, facilitando sua purificação usando colunas de afinidade de metal ou resinas de afinidade de histidina.

Após sequenciamento e análises de sequências comparando com outros scFvs patenteados (ou em processo de patente), foi possível identificar 13 clones com maior possibilidade de serem patenteados. Assim, a prioridade passou a ser produzir e purificar esses 13 clones na linhagem Shuffle® *pLys Y*, visto que essa linhagem possui genes específicos envolvidos na formação de pontes dissulfeto, ajudando no correto dobramento e solubilidade das proteínas heterólogas. A linhagem Shuffle® *pLys Y* é projetada para superar a formação de corpos de inclusão durante a expressão.

Em relação à análise do tempo de indução, foram tomadas amostras das produções em diferentes momentos 1h, 2h, 4h, 8h e 16h, sendo evidenciado um aumento significativo da expressão nos tempos de indução de 8h e 16h (Figura 9).

² Biblioteca desenvolvida por Verenice Paredes no LabMIB.

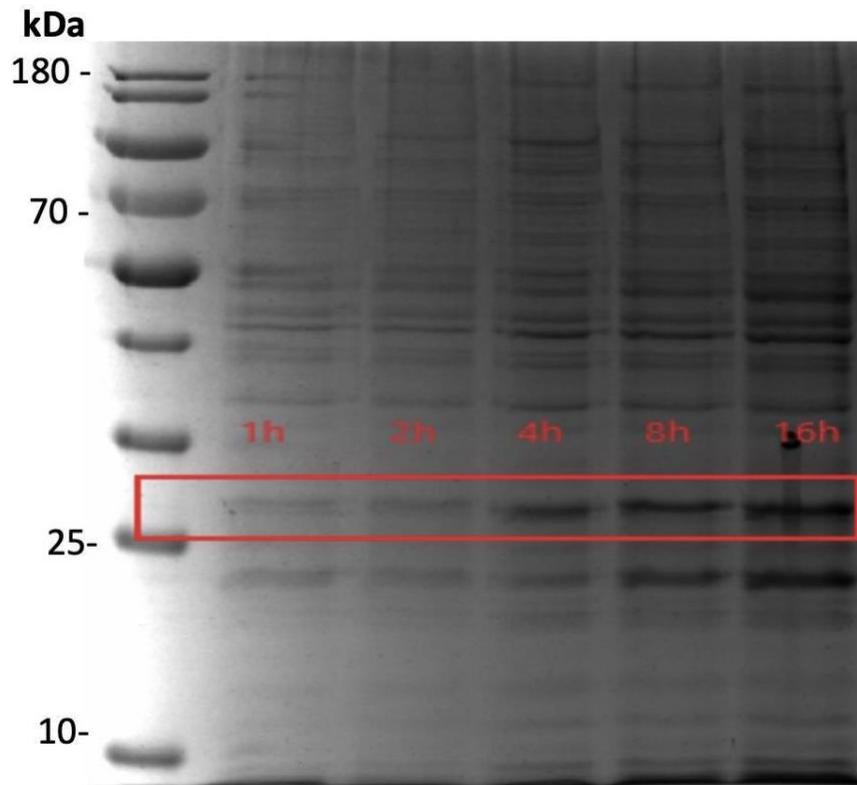


Figura 9. Análise de produção dos scFvs na bactéria SHuffle® pLys Y.

Análise de produção dos scFvs em bactéria SHuffle® pLys Y Extrato celular total, após 1h, 2h, 4h, 8h, 16h após indução com IPTG (1 mM) a 25 °C; por SDS-PAGE (desnaturante e redutor, 12%). O quadro vermelho ressalta as bandas correspondentes ao scFv de aproximadamente 28 kDa. M: Marcador de peso molecular PageRuler de Thermo Fisher.

A cinética de expressão dos anticorpos foi avaliada, após sonicação e posterior purificação por cromatografia de afinidade com colunas de níquel, em eletroforese de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) (Figura 10).

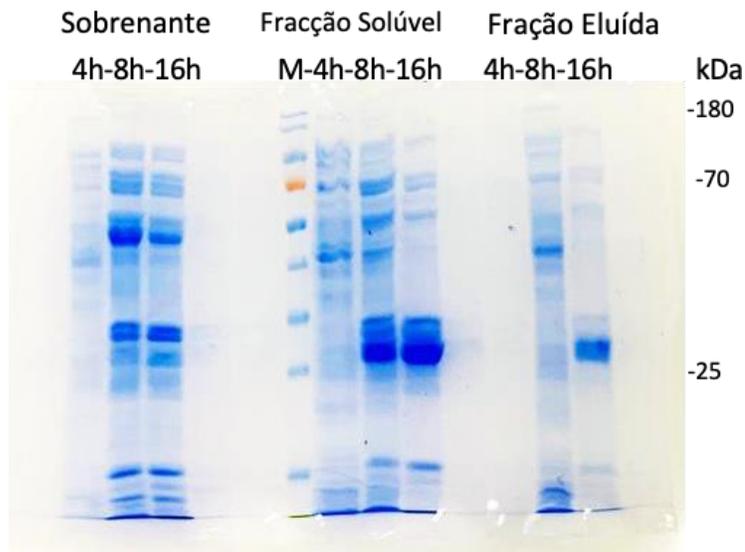


Figura 10. SDS-PAGE de expressão dos scFvs.

Análise por SDS-PAGE (desnaturante e redutor, 12%) da expressão dos anticorpos em 4h, 8h e 16h após a indução com IPTG: Sobrenadante; Fração solúvel; Fração eluída com 500 mM de Imidazol em colunas de níquel; M: Marcador de peso molecular PageRuler de Thermo Fisher.

Após análises, observa-se a banda de aproximadamente 28 kDa correspondente ao tamanho do anticorpo desnaturado e reduzido. Não se observou diferença significativa na produção entre os tempos de 8 h e 16 h, sendo escolhido o tempo de 16 h para produções futuras.

Foi quantificado o rendimento da produção dos anticorpos. Os rendimentos da produção e concentração final foram calculados da seguinte forma:

$$\text{Rendimento de purificação (\%)} = \frac{\text{Quantidade quantificada após purificação (ng)}}{\text{Quantidade inicial no flow-through (ng)}} * 100$$

$$\text{Massa total (mg)} = \text{Concentração dos anticorpos (mg/mL)} * \text{Volume total da solução final (mL)}$$

Dos 13 anticorpos, 6 foram produzidos em maior quantidade, a partir de serem identificados como os melhores ligantes a proteína Spike com a mutação D614G presente em todas as variantes de SARS Cov 2 sendo a mutação D614G uma mutação fora do RBD, e portanto fora da região onde os scFvs se ligariam dado que fizemos o panning com o RBD como proteína alvo, e demonstraram potencialidades de ligação e bloqueio por ensaio de ELISA e citometria (Tabela 8). Assim, foram escolhidos esses anticorpos para testes posteriores.

Tabela 8. Testes funcionais de ligação e bloqueio dos scFvs produzidos nas variantes Alfa (UK), Beta (AS) e Gama (P1).
Fonte: Arquivo do LabMIB.

Clone	D614G	Ligação à spike por citometria			Bloqueio por citometria			Bloqueio por ELISA			
		Alfa (UK)	Beta (AS)	Gamma (P1)	Alfa (UK)	Beta (AS)	Gamma (P1)	Alfa (UK)	Beta (AS)	Gamma (P1)	
		(+)	(-)	(N)	(+)	(-)	(N)	(+)	(-)	(N)	
4-4	alta	+	N	+	N	N	N	N	+	++	+
4-10	muito baixa	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4-15	alta	+	N	-	N	N	N	N	+	-	-
4-20	media	+	N	+	N	N	N	N	+	-	-
4-27	baixa	-	N	-	N	N	N	N	N	N	N
4-34	media	+	N	+	N	N	N	N	+	+	+
4-36	alta	+	N	-	N	N	N	N	+	+	++
4-37	media	+	N	+	N	N	N	N	+	-	-
4-47	media	+	N	-	N	N	N	N	N	N	N
4-67	media	+	N	-	N	N	N	N	+	-	-
4-87	baixa	-	N	-	N	N	N	N	N	N	N
3-3	alta	+	N	+	N	N	N	+	N	+	++
3-64	alta	+	N	+	N	N	N	+	N	+	+
3-71	media	-	N	-	N	N	N	N	N	N	N
3-83	media	+	N	+	N	N	N	N	+	++	+

A média de produção dos 6 scFvs selecionados foi de 42,8%. Os scFvs 3-3, 3-83, 4-4, 4-34, 4-36 e 4-87 foram produzidos na concentração de 4,5 mg/ml; 4 mg/ml; 3 mg/ml; 4,8 mg/ml; 3,95 mg/ml e 3,5 mg/ml respectivamente.

Os anticorpos recombinantes após os processos de purificação de cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA foram sujeitos a uma segunda etapa de purificação por gel-filtração, para a remoção de proteínas não específicas, e remover o imidazol de nossa proteína e aumentar o grau de pureza. As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) como aparece na Figura 11.

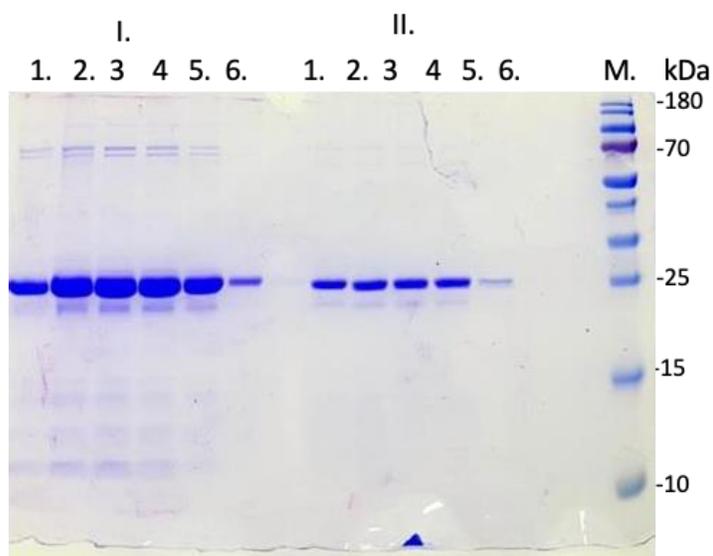


Figura 11. SDS-PAGE de Purificação dos scFvs.

Análises por SDS-PAGE (desnaturante e redutor, 12%) para análise de pureza dos scFv (I) purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA seguida de um segundo momento de purificação por (II) exclusão molecular. (1) scFv 3-3; (2) scFv 3-83; (3) scFv 4-4; (4) scFv 4-87; (5) scFv 4-34, (6) scFv 4-36;.M: Marcador de peso molecular PageRuler de Thermo Fisher. Proteína de interesse na altura aproximada de 28 kDa.

Também foram analisadas por imunoenensaio (Western-Blot) usando o anticorpo anti-HIS-tag (Figura 12). Nos resultados pode-se observar a presença das bandas correspondente ao tamanho de aproximadamente 28 kDa que corresponde ao tamanho para uma molécula de fragmento de anticorpo no formato scFv, revelando o grau de integridade da proteína após sua expressão e purificação, mostrando o sucesso nesses passos.

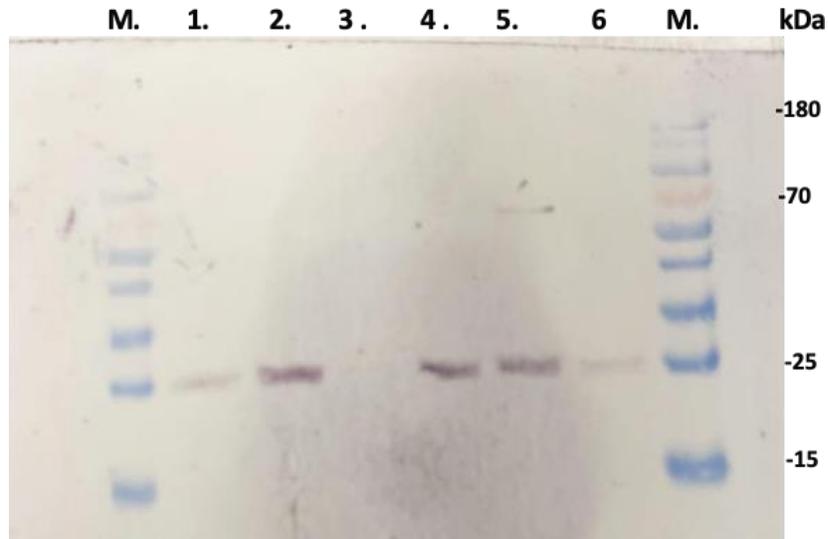


Figura 12. Western-Blot após purificação para análise de identidade dos scFv.

Western-Blot das frações de purificação. A detecção do scFv foi realizada pelo uso de anticorpo monoclonal anti-HIS-tag conjugado à fosfatase alcalina: (1) scFv 3-3; (2) scFv 3-83; (3) scFv 4-4; (4) scFv 4-87; (5) scFv 4-34, (6) scFv 4-36; M-Marcador de peso molecular PageRuler de Thermo Fisher. Proteína de interesse na altura correspondente de 28 kDa.

Os scFvs foram expressos por um sistema de expressão heteróloga em bactérias Shuffle® *plys Y*. O peso molecular das proteínas scFv foi de aproximadamente 28 kDa, o que foi consistente com fragmentos de anticorpos em formatos scFv. É possível afirmar que foram desenvolvidas com sucesso a purificação e produção das 6 proteínas selecionadas por este método.

6.3 Caracterização de proteínas scFvs purificadas³.

A caracterização dos fragmentos de anticorpos - scFvs contra o SARS-CoV-2 envolve a produção e purificação dessas moléculas de proteína, bem como a avaliação de sua especificidade e afinidade pelo vírus. Isso pode ser feito por meio de técnicas como ensaios de ELISA (ensaio imunoenzimático), ensaios de ligação, ensaios de

³ Foram feitas análises mais aprofundadas descrevendo as mutações nos aminoácidos pontuais somáticas e juncionais conservativas e não conservativas, de cada um dos anticorpos produzidos, mas por se tratar de um conteúdo patenteável, foram retiradas para preservar a confidencialidade, não sendo finalmente documentadas no texto da tese.

imunoprecipitação e ensaios de neutralização viral. Os scFvs foram produzidos a partir da combinação de uma região variável de anticorpos (VH e VL) com uma região constante de uma cadeia pesada ou leve, respectivamente, formando um único polipeptídeo.

A caracterização completa dos scFvs é essencial para determinar sua eficácia e segurança como possíveis terapias contra o SARS-CoV-2. Com base nesses estudos, os scFvs podem ser selecionados para avançar em estudos pré-clínicos e potencialmente se tornar uma terapia aprovada para o tratamento da COVID-19.

Aqui, as sequências de clones foram descritas de acordo com sua variável pesada de imunoglobulina pesada (IGHV) e a cadeia leve (Tabela 9).

Tabela 9. Descrição de características dos clones selecionados.

Clones	VH	Cadeia Leve
3-3	HV3-53*01	Kappa
3-83	HV3-53*01	Lambda
4-4	HV3-66*01	Kappa
4-34	HV3-53*01	Kappa
4-36	HV3-66*01	Kappa
4-87	HV3-53*01	Kappa

Por meio da hipermutação somática (SHM), a maturação da afinidade aumenta ainda mais a afinidade dos anticorpos para o antígeno. Como existem tantos antígenos possíveis diferentes, a recombinação V(D)J e a SHM garantem que um repertório variado

de anticorpos esteja disponível para uma resposta imunológica. A produção de diversos anticorpos ocorre através da recombinação V(D)J. A região de codificação da cadeia pesada é composta por três genes, um de cada uma das variáveis (V), diversidade (D) e loci de junção (J). IGHV, IGHD e IGHJ, respectivamente, representam os genes em humanos que codificam para as regiões V, D e J. O exon V codifica dois dos domínios que determinam a complementaridade da cadeia pesada (CDRs H1 e H2), enquanto a junção V(D)J produz a terceira (CDRH3). Se o gene D estivesse presente, a construção da área de codificação da cadeia leve procederia de forma semelhante. IGKV e IGKJ, bem como IGLV e IGLJ, são as abreviações para as cadeias Kappa e Lambda que também são codificadas pelos genes da cadeia leve.

Em nossos anticorpos, nas sequências das cadeias leves existem aminoácidos codificados por sequências que diferem da linha germinal e, em consequência, de outras possíveis mutações de maturação de afinidade. Em relação com a cadeia leve, é importante ressaltar que o clone 3-83 tem uma diferenciação com os outros clones porque apresenta cadeia leve Lambda, enquanto os restantes usam cadeias leves Kappa. Apesar de que nenhuma das cadeias leves podem ser consideradas idênticas, existem semelhanças entre as usadas por 3-3, 4-4, 4-34 e 4-36. Em todos os clones, a variabilidade juncional retirou nucleótidos da sequência de aminoácidos, e os CDR3 ficaram com até dois aminoácidos a menos. Vale também ressaltar a existência de diversas mutações nas regiões *framework* - FR¹⁴⁴, chamando importantemente a atenção como região de interesse.

Em relação às cadeias pesadas, as sequências de cadeias pesadas de 3-83, 4-4 e 4-36 são idênticas. Encontra-se que quase todos os anticorpos tiveram mutações geradas por variabilidade juncional no CDR3. Da mesma forma aparecem mutações no CDR1 em quatro clones: 4-4, 4-87, 4-34 e 4-36. Finalmente, todos os anticorpos tiveram uma mesma mutação no primeiro resíduo da região FR3, trocando de uma tirosina para uma

⁴ As regiões estruturais (ou *frameworks* - FR) são regiões altamente conservadas da porção variável do anticorpo. A razão evolutiva para a conservação dessas regiões é apoiar o dobramento adequado do anticorpo, permitindo que as regiões CDR sejam estabilizadas. A dobragem em FR leva à flexibilidade da estrutura do anticorpo ou rigidez da região de ligação do anticorpo.

fenilalanina.

A partir de estudos anteriores publicados em revistas de alto impacto que descreveram mAbs de pessoas com histórico de infecção por SARS-CoV-2 descobertos por diferentes técnicas, realizou-se uma análise de semelhança mediante alinhamento de sequências, que permitiu comparar as sequências de nossos anticorpos com as sequências de anticorpos depositados em diferentes bancos de dados com aproximadamente 12.000 sequências de anticorpos achadas. Foram implementadas três formas de buscar informação sobre os anticorpos isolados: 1) artigos que falam desses anticorpos, 2) busca por similaridade de sequências e a 3) busca em banco de dados específicos de anticorpos contra SARS-CoV-2.

O agrupamento foi realizado comparando as sequências de aminoácidos da cadeia pesada (VH) e da região de determinação de complementaridade da cadeia pesada (CDRH3) de cada clone de anticorpos para identificar clonótipos compartilhados. O clonótipo compartilhado refere-se a clones de anticorpos envolvendo o mesmo gene V, o mesmo gene J, o mesmo comprimento de CDR3 e sequências de aminoácidos CDRH3 de alta identidade entre os anticorpos. Aqui, agrupamos todos os clones codificados por VH3- 53/3-66 usando uma percentagem de identidade maior que 80% de VH e CDRH3 como limite, analisando os resultados de alinhamento de sequências por BLASTP (*Protein Basic Local Alignment Search Tool*) contra os bancos de dados PDB (Protein Data Bank; em português: Banco de Dados de Proteínas e CovAD (*Coronavírus antibody database*)). Em seguida, foi usado o programa CLUSTAL Omega para análise de alinhamento múltiplo de sequências para identificar as substituições menos conservativas nas sequências VH e CDRH3, entre nossos anticorpos e os anticorpos identificados com maior identidade nas bases de dados.

A CDRH3 é um indicador da diversidade de anticorpos e é a mais variável em termos de composição e comprimento de aminoácidos, uma vez que é composta de segmentos de genes V, D e J. O comprimento típico do CDRH3 de 15 aminoácidos no repertório humano *naive* (BRINEY et al., 2019), mas sessões estendidas de CDRH3 de 20 a 35

aminoácidos são essenciais para interações antígeno-anticorpo de alta afinidade para uma fração do vírus da gripe e anticorpos amplamente neutralizantes do HIV-1 (WU et al., 2017; YU; GUAN, 2014). A distribuição do comprimento do CDRH3 mostrou uma diferença significativa, embora o comprimento médio do CDRH3 das células B específicas da proteína SARS-CoV-2 S isoladas não tenham diferido significativamente do de uma população *naïve*. A predominância de CDRH3s mais longos (20 aminoácidos) é em grande parte responsável por essa variação na distribuição de CDRH3, o que resulta em uma distribuição bimodal em oposição à distribuição em forma de sino vista no repertório *naïve*. Os domínios de união do antígeno (CDR) dos anticorpos são as regiões das imunoglobulinas que são unificadas aos antígenos. Os CDR são regiões de sequências de aminoácidos dos anticorpos que se unem para formar uma estrutura tridimensional que se ajusta a um antígeno específico. Os CDR dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 foram estudados para determinar sua relação com a neutralização do vírus. Os estudos demonstraram que os CDR compridos são mais propensos a se unir ao vírus e a neutralizá-lo do que os CDR curtos, visto que são capazes de se unir ao vírus em uma área maior que os CDR curtos. Isso no CDR traz uma grande probabilidade de se unir ao vírus de uma maneira que bloqueie a infecção. Às vezes, os CDR mais compridos também são mais flexíveis que os CDR curtos. Isso permite que o anticorpo se junte ao vírus de uma maneira mais adaptável. Isso é importante porque o vírus está em constante mutação, e os anticorpos devem ser capazes de se adaptar às novas mutações do vírus (DEJNIRATTISAI et al., 2021; YAN et al., 2021).

Apesar da gigante variabilidade que podem ter os anticorpos, vários pacientes convalescentes com SARS-CoV-2 demonstraram ter anticorpos para o RBD com sequências surpreendentemente comparáveis (TAN et al., 2021). Se esses anticorpos tiverem o mesmo gene IGHV e sequências CDR H3 comparáveis, eles podem ser categorizados como clonótipos públicos. Um clonótipo refere-se a um tipo específico de receptor de células imunes encontrado no sistema imunológico humano (CHEN et al., 2021). Quando se trata de SARS-CoV-2, um clonótipo público refere-se a uma coleção de sequências com o mesmo evento de recombinação V(D)J, comprimento idêntico da

região determinante complementar de cadeia pesada e sequências de aminoácidos CDRH3 com 80% de identidade é compartilhada entre diferentes indivíduos que foram infectados com o vírus. Os clonótipos públicos são de interesse no estudo da resposta imune ao SARS-CoV-2 e no desenvolvimento de possíveis tratamentos ou vacinas (CHEN et al., 2021; TAN et al., 2021).

Os anticorpos IGHV3-53/3-66 para o RBD são os anticorpos que compartilham os mesmos genes IGL(K)V. Os dois clonótipos mais comuns têm um comprimento CDRH3 de 9 aminoácidos e são pareados com cadeias leves IGKV1-9 (clonótipo 1) e IGKV3-20 (clonótipo 2), respectivamente. Os clonótipos 1 e 2 de anticorpos IGHV3-53/3-66 para SARS-CoV-2-RBD se acoplam com mais frequência com certos genes IGHJ e têm características distintas de sequência CDRH3.

Na revisão realizada, os anticorpos do clonótipo 2 aparecem descritos em 7 estudos (JU et al., 2020; ROGERS et al., 2020; ROBBIANI et al., 2020; HAN et al., 2021; KREYE et al., 2020; KREER et al., 2020; DU et al., 2020) enquanto os anticorpos do clonótipo 1 foram vistos em 10 investigações (CAO et al., 2020; HAN et al., 2021; JU et al., 2020a; KREYE et al., 2020; LIU et al., 2020; ROBBIANI et al., 2020; ROGERS et al., 2020; ZOST et al., 2020). É interessante notar que as diferenças de sequência CDRH3 entre os anticorpos do clonótipo 1 e do clonótipo 2 foram descobertas por logotipos de sequência. Em nosso caso, os anticorpos produzidos podem ser categorizados em sua maioria como anticorpos clonótipo 2.

Na revisão realizada, a resposta imune contra o SARS-CoV-2 demonstrou ser significativamente influenciada por anticorpos com a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina IGHV3-53, o qual é congruente com nossos resultados. O gene IGHV3-53, que é um componente do repertório de anticorpos humanos, é conhecido por desempenhar um papel na geração de anticorpos que têm uma ampla gama de alvos específicos de patógenos. Esses anticorpos foram encontrados em pessoas que tinham COVID-19, mas se recuperaram (convalescentes), e mostraram excelente atividade antiviral. Os anticorpos IGHV3-53 foram estudados, descobrindo que podem se ligar com

sucesso à proteína Spike de SARS-CoV-2, que é essencial para a entrada viral nas células hospedeiras (CHEN et al., 2021; WU et al., 2020b; YAN et al., 2021).

O éxon IGHV3-53 de cadeia pesada é frequentemente usado entre os mAbs direcionados a RBD, a maioria dos mAbs gerados codificados por IGHV3-53 mostraram atividades neutralizantes. (YAN et al., 2021). IGHV3-53-J6, como clonótipo público exibiu características de IGHV3-53, IGJH6 (J6) e um CDRH3 de 11 aminoácidos como característica central (BROUWER et al., 2020; WU et al., 2020c). O clonótipo VH3-53-J6 foi derivado de rearranjos gênicos que foram conservados evolutivamente. Esses anticorpos VH3-53-J6 têm poucas hipermutações somáticas, sugerindo que muitas pessoas podem ter pré-programado em sua sequência germinativa para geração rápida de anticorpos direcionados a RBD. Os scFvs que compartilham este clonótipo neutralizam o SARS-CoV-2 através do bloqueio da interação entre o RBD e o receptor celular ACE2 (YUAN et al., 2020b). Em nosso caso, os anticorpos 3-3, 3-83, 4-87 e 4-34 compartilham o clonótipo VH3-53-J6.

Segundo discutido na literatura, os anticorpos IGHV3-53 geralmente têm uma CDRH3 curta (menos de 15 aminoácidos). No entanto, outro número reduzido de anticorpos IGHV3-53 contra o RBD contém uma CDRH3 mais longa (TAN et al., 2021). As estruturas cristalinas dos anticorpos neutralizantes IGHV3-53 demonstram que uma CDRH3 mais longa pode ter um modo de ligação diferente. Essas duas classes de anticorpos IGHV3-53 visam o local de ligação do receptor ACE2, mas com ângulos e interações moleculares muito diferentes (DEJNIRATTISAI et al., 2021; YAN et al., 2021). De forma importante deve ser destacado que essas descobertas enfatizam a versatilidade do IGHV3-53, também manifestada em nossos scFvs, nesta resposta comum de anticorpos ao SARS-CoV-2, onde os recursos conservados codificados na linhagem germinativa do IGHV3-53 podem se combinar com os comprimentos de CDRH3 e de cadeia leve diferentes, tendo diferentes consequências no reconhecimento e neutralização do vírus.

Yuan et al (2020) analisaram 294 anticorpos anti-SARS-CoV-2 de pacientes com COVID-19 e descobriram que a variável pesada de imunoglobulina 3-53 (IGHV3-53)

representa o gene IGHV mais usado, com 10% codificado por IGHV3-53. Os autores determinaram as estruturas cristalinas de dois anticorpos CC12.1 e CC12.3, codificados pelo gene em comum IGHV3-53, mas pertencentes a diferentes clonótipos, a fim de definir as características estruturais e adicionar propriedades favoráveis para o reconhecimento de RBD ao IGHV3-53. O estudo descobriu que os anticorpos codificados pelo gene IGHV3-53 foram os mais usados e potentes, com CC12.1 e CC12.3 estando entre os quatro principais anticorpos altamente neutralizantes (YUAN et al., 2020).

Assim, o IGHV3-53 fornece uma estrutura versátil para atingir o local de ligação ACE2 no SARS-CoV-2 RBD. O estudo de Yuan et al (2020) permitiu compreender as características moleculares dos anticorpos codificados por IGHV3-53 e dos anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2, sendo necessários para gerar imunógenos que possam apresentar epítomos neutralizantes de maneira ideal ao sistema imunológico, o que pode abrir novos horizontes para o design de tratamentos eficazes contra a SARS-CoV-2 (FAGIANI; CATANZARO; LANNI, 2020).

O *motivo* NY no CDR H1 e o *motivo* SGGS no CDR H2 são características codificadas por linha germinativa que são essenciais para a ligação ao RBD e estão presentes nos anticorpos IGHV3-53/3-66. Além de IGHV3-53, apenas o IGHV3-66 contém um *motivo* NY na CDR H1 e um *motivo* SGGS na CDR H2. O IGHV3-66 é comumente observado em anticorpos em pacientes com SARS-CoV-2 e também está bem representado no repertório de indivíduos saudáveis (0,3 a 1,7% do total de anticorpos) (BOYD et al., 2010; JU et al., 2020b; SHI et al., 2020; YUAN et al., 2020b). Os 6 scFvs deste trabalho reúnem os dois motivos descritos como cruciais na linha germinativa IGHV3-53/3-66 para a ligação ao RBD consistentes em um motivo NY em resíduos VH 37 e 38 no CDR H1 e um motivo SGGS em resíduos VH 58 a 64 no CDR H2

Yuan et al (2020) sugerem que os anticorpos codificados por VH3-53, derivados do gene IGHV3-53 da linhagem germinativa, podem bloquear a interação entre o vírus SARS-CoV-2 e o receptor ACE2, que é como o vírus entra nas células humanas. Estes resultados são congruentes com alguns testes feitos pelo nosso grupo de pesquisa no

LabMIB (Tabela 10). Este importante estudo de Yuan et al (2020) ressaltou que muitas pessoas podem ter sequências pré-programadas em seus genes para a geração rápida desses anticorpos, tornando-os um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas.

Clone	Bloqueio por ELISA		
	Alfa (UK)	Beta (AS)	Gama (P1)
3-3	+	++	++
3-83	+	++	+
4-4	+	++	+
4-34	+	+	+
4-36	+	+	++
4-87	N	N	N

Tabela 10. Resultados de ensaios de bloqueio por ELISA realizados pela equipe do LabMIB, UnB.

(N) não testado, (-) não se observa ligação, ou bloqueio, (+) liga ou bloqueia razoavelmente, (++) melhor bloqueio ou ligação.

Um alinhamento múltiplo das sequências dos scFvs permite identificar as posições com resíduos 100% idênticos entre as sequências (*), as mudanças conservativas (:), e as que são menos conservativas (.). Destas, as menos conservativas implicam mudanças na sequência de aminoácidos da região variável do scFv, tendo impactos nas propriedades químicas e estruturais dos anticorpos. Devido a isto, são as substituições de maior relevância para análise de função e especificidade do anticorpo de que se trate.

A CDRH3 de cadeia pesada do scFv 3-3 e 4-87 contém 11 aminoácidos, enquanto a dos scFvs 3-83, 4-4, 4-34 e 4-36 têm 12 aminoácidos. Os comprimentos indicam cadeias de CDRH3 curtas.

Na análise bioinformática realizada, obtivemos que para o scFv 3-3 existem 81 entradas no CoV-AbDab⁵, sendo o anticorpo BD-395 isolado de pacientes vacinados a correspondência mais próxima com identidade de Adab 87,93% nas suas sequências e compartilhando a linha germinal IGHV3-53, e anticorpo que liga e neutraliza as variantes SARS-CoV2_WT; SARS-CoV1; SARS-CoV2 Ômicron-BA2.12.1; SARS-CoV 2 Ômicron- BA1; SARS-CoV 2 Ômicron-BA2.

Da mesma forma existem 2455 CDRH3s no CoV-AbDab similares a 3-3, sendo o anticorpo com a correspondência mais próxima o YB9-258 isolado de pacientes infectados com a variante SARS-CoV 2 Ômicron, com 60,00% de identidade, anticorpo que liga as variantes SARS-CoV2_Ômicron_WT (levemente); SARS-CoV 2 Ômicron-Beta; SARS-CoV2 e neutraliza as variantes SARS-CoV2_Ômicron_WT (levemente); SARS-CoV2_ Ômicron-Beta; SARS-CoV2_Delta; SARS-CoV2_Ômicron.

Na análise CLUSTAL OMEGA não aparecem substituições menos conservativas entre as sequências completas da cadeia pesada de 3-3 e BD-395, incluindo a região CDRH3. Em relação com YB9-258, foram identificadas substituições menos conservativas no CDRH3.

No caso do scFv 4-34 foram identificadas 204 entradas no CoV-AbDab, sendo o anticorpo COVA2-04 isolado de pacientes afetados pelo SARS-CoV2_WT a correspondência mais próxima com identidade de 91,53%. Suas sequências compartilham a linha germinal IGHV3-53, e o anticorpo COVA2-04 se liga às variantes SARS- CoV2_WT; SARS-CoV1 e neutraliza só a variante SARS-CoV2_WT.

Existem 1358 CDRH3s no CoV-AbDab similares a 4-34, sendo o anticorpo com maior porcentagem de o COVA2-04 também, com 83,33%. Na análise de CLUSTAL, aparecem substituições menos conservativas entre as sequências completas das cadeias pesadas de 3-43 e COVA2-04.

⁵ As consultas realizadas em CoV-AbDab para cada sequência analisada aconteceram entre os dias 5-12 junho de 2023.

Na nossa análise realizada na base de dados CoV-AbDab, obtivemos que para 3-83 existem 204 sequências que têm o mesmo comprimento; sendo o anticorpo C2232, que compartilha a linha germinal IGHV3-53, de maior identidade 95.76%. Este anticorpo C2232 é isolado de pacientes vacinados contra a variante SARS-CoV2_WT, sendo, portanto, um anticorpo que liga e neutraliza só a variante SARS-CoV2_WT.

Na análise da comparação do CDRH3 da cadeia pesada do anticorpo 3-83, foi achado 91.67% de identidade com o anticorpo BD56-423, isolado de pacientes vacinados, que demonstrou ligação e neutralização para as variantes SARS-CoV2_WT; SARS-CoV2_Ômicron-BA1; SARS-CoV2_Ômicron-BA1.1; SARS-CoV2_Ômicron-BA3; SARS-CoV2_Ômicron-BA2; SARS-CoV2_Ômicron-BA2.12.1; SARS-CoV2_Ômicron-BA2.13; SARS-CoV2_Ômicron-BA4/BA5; SARS-CoV2_Ômicron-BA2.75; SARS-CoV2_Ômicron-BA5. A análise CLUSTAL entre o scFv 4-34 e BD56-423 apresenta uma substituição não conservativa.

Os scFv 4-4 e 4-36 compartilham a linha germinal IGHV3-66*01. A busca em CoV-AbDab oferece 204 entradas para 4-4 e para 4-36 na análise de identidade, sendo o anticorpo CQTS083 com 94.92% que maior percentual apresenta na comparação da cadeia pesada, sendo um scFv HV3-66. Este anticorpo se une a SARS-CoV2_WT (de forma fraca). Em relação ao CDRH3, apareceram 1357 entradas, com o WIBP-2B11 com 91.67% nos primeiros lugares de identidade com o scFv 4-4 e 4-36. Este scFv se une a SARS-CoV2_WT; SARS-CoV 1; Pangolin-GD; RatG13 e neutraliza SARS-CoV 2- WT; Pangolin-GD; RatG13. A análise de CLUSTAL não destaca substituições menos conservativas entre 4-4/4-36 e WIBP-2B11.

No caso do 4-87 existem 346 entradas no CoV-AbDab. O anticorpo COVOX-158 com a mesma linha germinal IGHV3-53, com 88.03% de identidade, se liga ao SARS-CoV2_WT; SARS-CoV2_Alfa; SARS-CoV2_Beta; SARS-CoV2_Gama; SARS-CoV2Delta; SARS-CoV2_Ômicron-BA1.1 (de forma fraca); SARS-CoV2_Ômicron-BA2 (de forma fraca), e neutraliza as variantes SARS-CoV2_WT; SARS-CoV2_Alfa; SARS-CoV2_Beta (de forma fraca); SARS-CoV2_Gama (de forma fraca); SARS-CoV2_Delta.

Existem 2424 CDR3s no CoV-AbDab similares a 4-87, sendo COVOX-158, mais uma vez, o anticorpo com maior porcentagem de identidade (63.4%). Na análise de CLUSTAL, aparecem substituições menos conservativas entre as sequências completas das cadeias pesadas de 4-87 e COVOX. No mesmo tipo de análise, na CDRH3 aparece só uma substituição identificada como menos conservativa no CLUSTAL.

6.4 Ensaio de ligação do scFv à proteína Spike do SARS-CoV-2 por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo foi a técnica usada para analisar a ligação dos scFvs à proteína S e as diferentes mutações, variantes e sub-linhagens do SARS-CoV-2. Esta técnica permite a análise quantitativa de células individuais em suspensão, avaliando a expressão de marcadores de superfície ou outros parâmetros celulares. Especificamente em nosso caso foi usada para quantificar a ligação dos scFvs aos diferentes alvos. O ensaio de ligação dos scFvs à proteína S por citometria é uma ferramenta valiosa para a caracterização de scFvs específicos para o SARS-CoV-2 e pode ser usado em conjunto com outras técnicas de caracterização para selecionar os scFvs mais promissores para uso em terapias contra a COVID-19.

Seguido da purificação, os anticorpos foram testados por citometria de fluxo para verificar sua ligação às diferentes variantes circundantes e mutação frequentes em elas. Células HEK293 foram transfectadas com vetores que codificam a proteína S contendo as diferentes mutações (D1614G), variantes [Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ômicron (BA.1) e sublinhagens (Ômicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5)], para quantificar a ligação à proteína de membrana do SARS-CoV-2.

As células de rim de embrião humano (HEK293) são comumente utilizadas para a produção de proteínas heterólogas terapêuticas. Apesar da disponibilidade de uma ampla variedade de linhas celulares, as células HEK293 tornaram-se células padrão utilizadas na produção de proteínas recombinantes. Na atualidade quase 70% de todas as proteínas terapêuticas recombinantes são produzidas com elas. As células obtidas a

partir do rim de um embrião humano são uma ótima alternativa para a produção de glicoproteínas. Estas linhagens celulares são bem caracterizadas e permitem a transfecção, a amplificação e a seleção de clones produtores de proteína recombinante estáveis e moléculas complexas, e foram usadas como veículo de expressão de proteínas específicas de interesse para a pesquisa. Para as proteínas terapêuticas serem eficazes, elas devem ser sintetizadas em formas biologicamente ativas, exigindo o dobramento correto e as modificações pós-traducionais como glicosilação, que é um tipo de modificação onde certas porções de carboidrato são adicionadas a resíduos específicos de aminoácidos da proteína, característica importante para a estabilidade da proteína recombinante e também para sua ligação ao antígeno (RIASCO PALACIOS, 2015).

Foi assim que os vetores incluindo as sequências para as variantes e linhagens supracitadas foram transfectados com reagente FreeStyle MAX (Gibco) para expressão transiente e estável (em população mista) da proteína Spike com a mutação (D1614G), e as diferentes variantes [Alpha (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Omicron (BA.1)] e sublinhagens (Omicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5) na superfície de células de rim de embrião humano (HEK293). Como o gene da proteína S presente nesses vetores tem um domínio transmembrana, o que permitiu a expressão na superfície celular, e a marcação dessas células com os anticorpos em formato scFv biotinizados, além disso foram usadas células não transfectadas como controle negativo. Nos nossos resultados não observou uma ligação dos anticorpos às células não transfectadas, outro controle utilizado foram as células + DAPI⁶ usado para marcação de células vivas.

Os histogramas da citometria de fluxo para ligação dos scFvs a mutação (D1614G), e as diferentes variantes [Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ômicron (BA.1)] e sublinhagens (Ômicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5), aparecem nas Figuras 13 e 14. Os percentis de ligação foram sistematizados para melhor compreensão na tabela 11.

⁶ DAPI, ou 4',6'-diamino-2-fenil-indol), é um marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões de DNA ricas em adenina-ticorante de DNA

Tabela 11. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com a mutação (D1614G), e as diferentes variantes e sublinhagens.

Variantes [Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ómicron (BA.1)] e sublinhagens (Ómicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5). Sistematização dos percentis de ligação por experimento realizado.

	3-3	3-83	4-4	4-87	4-34	4-36
D614G	28,6	8,23	19,9	5,24	31,8	14,3
B.1.1.7	11,0	7,34	1,22	4,67	4,62	0,93
B.1.617.2	12,1	6,32	8,80	3,77	12,0	7,87
BA.1	11,0	1,56	1,33	1,38	3,24	0,51
BA.2	2,98	0,94	0,40	1,12	1,79	0,52
BA.2.12.1	16,4	8,23	1,19	0,65	5,15	0,60
BA.4/5	10,7	2,71	0,76	3,24	1,22	0,63

Cao et al (2022) testou sete sub variantes Ómicron (BA.1, BA.1.1, BA.3, BA.2, BA.2.13, BA.2.12.1, BA. 4/5) que exibiram evasão substancial contra neutralização por anticorpos RBD de classe 1 e classe 2, ou seja, as variantes evitaram a neutralização por REGN-1093323 (casirivimab), LY-CoV01624 (etesevimab), LY-CoV55525 (bamlanivimab), COV2-21965 (tixagevimab) e BRII-19626 (amubarvimab), enquanto apenas BA.4/BA.5 evitou DXP-60415,27, que mostrou eficácia reduzida, mas ainda competitiva contra as sub variantes BA.1 e BA.2. Nossos anticorpos de classe 1 se ligaram as variantes BA.1.1, BA.1, BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5 com diferentes percentagens representados na tabela 10 e as figuras 15A-B, sendo o scFv 3-3 o anticorpo que maior percentagem de ligação apresentou para estas sub variantes Ómicron.

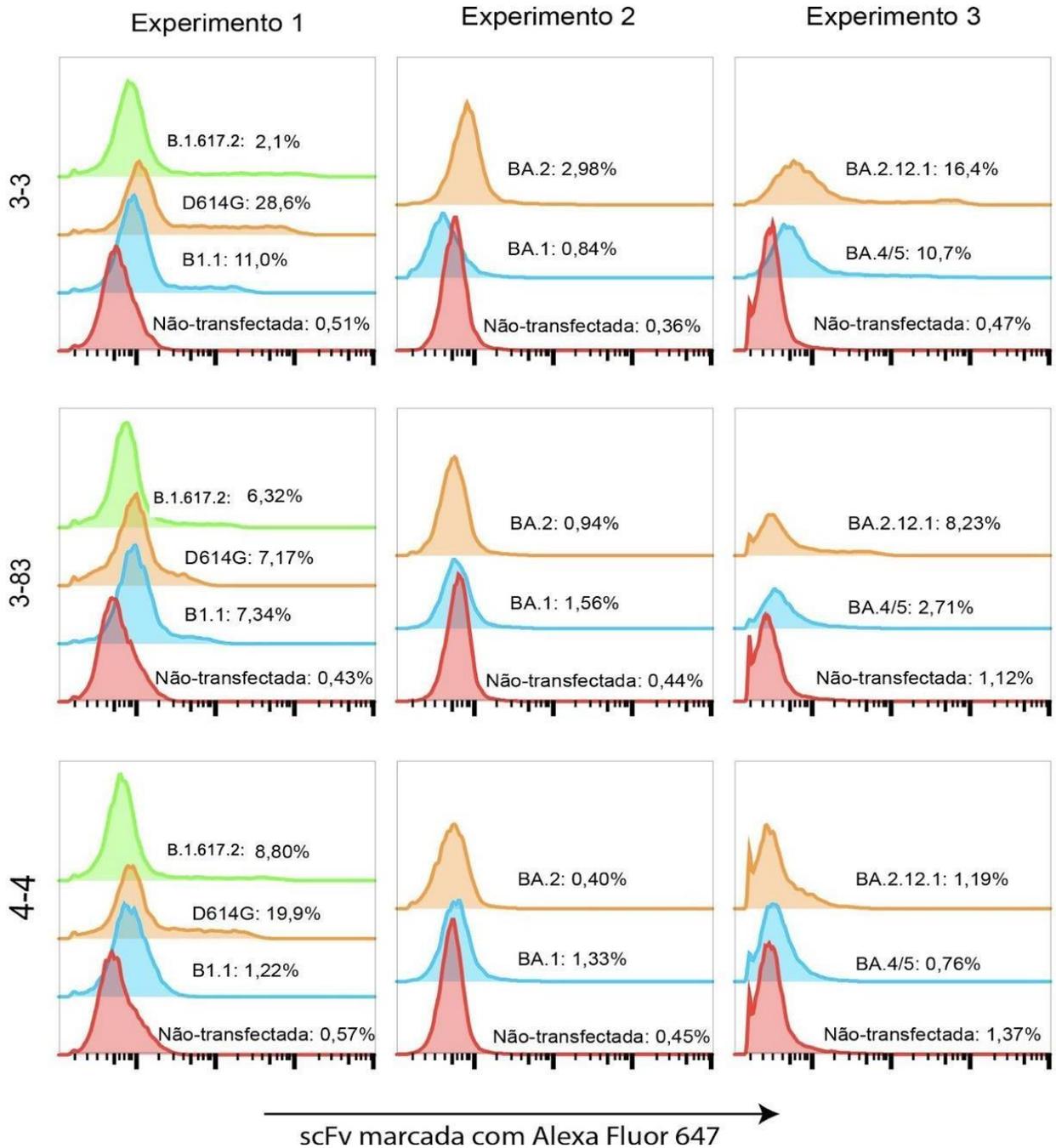


Figura 13. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com vetores incluindo a D1614G e as sequências para as variantes e linhagens e sublinhagens (I)

Diferentes variantes [Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ômicron (BA.1)] e sublinhagens (Ômicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5). Anticorpos 3-3, 3-83, 4-4.

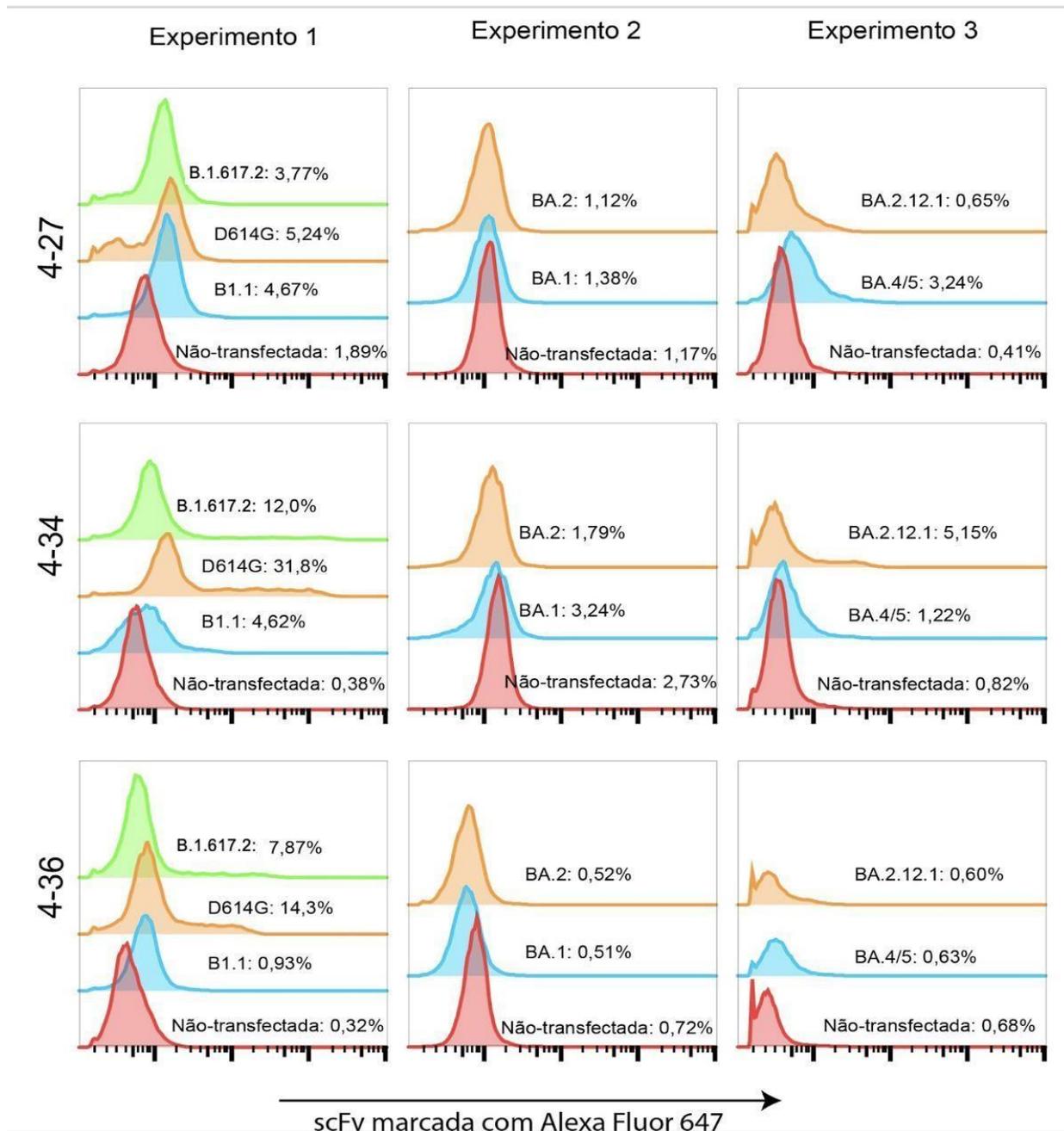


Figura 14. Ensaio de citometria de ligação dos scFv+AF647 à proteína S do SARS-CoV-2 em células HEK293F transfectadas com vetores incluindo a D1614G e as sequências para as variantes e linhagens e sublinhagens(II)

Diferentes variantes [Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), Ômicron (BA.1)] e sublinhagens (Ômicron BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5). Anticorpos 4-27, 4-34, 4-36.

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são projetados para imitar a resposta imune do corpo a um patógeno específico. Nossos anticorpos foram desenvolvidos para atingir e se ligar a região RBD específica da proteína Spike do SARS-CoV-2. No entanto, nem todos os mAbs são eficazes contra todas as variantes do vírus devido a alterações genéticas ou mutações que ocorrem no vírus ao longo do tempo. A partir da revisão da literatura, e do processo de pesquisa desenvolvido, algumas razões pelas quais os mAbs podem se vincular a certas variantes, mas não a outras podem ter a ver com especificações do anticorpo, variações do epítipo ou mudanças no epítipo alvo, mudanças estruturais, mutações de escape, mutações no local de ligação e ao efeito cumulativo de múltiplas mutações, entre as mais notáveis.

Como podemos observar nos resultados, os anticorpos tiveram uma alta percentagem de ligação a mutação D614G, variante que surgiu entre janeiro e fevereiro de 2020 com uma substituição D614G no gene codificante da proteína S, esta mutação está fora do RBD, portanto, esse vetor foi um controle importante dado que é o único que tem a sequência do RBD igual ao SARS-CoV-2 de Wuhan, mesma a que os pacientes foram expostos e a usada no phage display como alvo, sendo os anticorpos 3-3 e 4-34 os que mais forte ligação apresentam a esta mutação.

As mutações NTD 69/70 e 144 e a mutação RBD N501Y são as características distintivas da variante Alfa (B.1.1.7). Apesar de não conferir resistência aos mAbs, o Δ 69/70 no NTD aumenta a infecciosidade do vírus. Em comparação com a variante D614G, a variante Alfa promove a formação de sincício mais rapidamente, o que aumenta a fusão célula- célula. A mutação N501Y demonstrou melhorar a afinidade de ligação in vitro por interações hidrofóbicas do resíduo Y501 do RBD com o resíduo Y41 do ACE2 e interações favoráveis de empilhamento de catiões com K353 da ACE2. N501 é um dos principais resíduos que aumenta a afinidade de ligação RBD-ACE2 (MITTAL; KHATTRI; VERMA, 2022).

Uma pequena alteração geral na sensibilidade da variante Alfa a vários anticorpos neutralizantes potentes (nAbs) indica que as mutações na variante B.1.1.7 não resultaram

em um rearranjo estrutural significativo no RBD e NTD. Isto pode ser um dos motivos pelos quais a maioria dos nossos anticorpos mostraram uma ligação constante com esta variante, excetuando 4-4 e 4-36.

Em relação com a variante Delta (B.1.617.2), os resultados são diversos. Onze mutações na proteína S - T19R, T95I, G142D, 156-157, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R e D950N - definem essa variante. A mutação P681R, que acelera rapidamente a clivagem da Furina e leva ao aumento da fusogenicidade e patogenicidade, foi relatada como a mais conservada dessas mutações nesta linhagem. Curiosamente, a variante Delta é aproximadamente 60% mais transmissível do que a variante Alfa, apesar de ambas terem uma mutação *missense* na posição 681 do aminoácido com um resíduo de histidina (P681H).

O fato de os RBDs dessas variantes conterem várias mutações dentro e fora da superfície de ligação ao ACE2 sugere que o vírus estava acumulando mutações para evitar a detecção de anticorpos enquanto continua a se ligar ao ACE2. Por exemplo, a mutação L452R na versão Delta, que está presente perto da borda da superfície de ligação do ACE2, reduz a eficácia da neutralização do anticorpo. A variação Delta tem uma mutação rara em um local próximo, T478K, no lugar de E484K. Essa mutação permite o escape imunológico reduzindo ou eliminando a ligação da classe 1 e alguns nAbs da classe 2, o que pode ter sido o motivo para que algum de nossos anticorpos perdessem força de ligação a esta variante.

Na variante Ômicron (BA.1), a proteína Spike possui pelo menos 34 mutações, 15 das quais estão no RBD, sete no NTD e três perto do local de clivagem da furina. De acordo com a revisão da literatura, a proteína Spike da Ômicron torna o vírus ainda mais transmissível do que a variante Delta devido a certas mutações que foram reconhecidas como promotoras da transmissibilidade. Em um estudo recente, (PLANAS et al., 2022) descobriram que seis dos nove anticorpos monoclonais (mAbs) em uso clínico ou em desenvolvimento, incluindo LY-CoV555, LY-CoV016, REGN-10933, REGN-10987, Tixagevimab e Regdanvimab, perderam atividade antiviral contra Ômicron, enquanto

ADG-20 e Sotrovimab foram menos afetados pelas mutações na linhagem Ômicron. Este resultado é similar ao achado nas ligações com nossos anticorpos, onde 5 de 6 anticorpos demonstraram menor percentil de ligações, excetuando o caso do anticorpo 3-3 que manteve ligação razoável com esta variante e suas sublinhagens (BA.2, BA.2.12.1 e BA.4/5).

Vale ressaltar que a sublinhagem BA.2 difere da sublinhagem BA.1.1, em cerca de oito modificações na proteína S. T376A, D405N e R408S são três novas mutações em BA.2 em comparação com BA.1, enquanto G446S e G496S estão ausentes. A suscetibilidade de BA.1 e BA.2 a mAbs terapêuticos também difere significativamente (DHAWAN et al., 2022). Esta condição pode também ser considerada como explicação de nossos resultados de ligação com estas variantes.

A evidência sugere que BA.4/5, especialmente quando comparados a BA.1, têm propriedades patogênicas significativamente diferentes. Em particular, se a resposta imune humoral diminuiu ao longo do tempo, a maior proliferação e dominância de BA.4/5 foram associadas à sua capacidade de superar as defesas imunológicas adquiridas pela infecção e/ou vacinação anteriores. Ambos BA.4/5 são capazes de contornar a proteção oferecida por BA.1 de acordo com o teste in vitro de soros de indivíduos não infectados que foram previamente infectados com BA.1 (DHAWAN et al., 2022; MOHAPATRA et al., 2022). É imperativo ter em mente que as pessoas que não são imunizadas têm um risco muito maior de contrair a sublinhagem BA.4/5.

Em outros experimentos realizados com as variantes Alfa (B.1.1.7) e Gama (B.1.617.2) no LabMIB encontrou-se que para a variante Alfa, foi verificada ligação de 9,26% ao scFv 3-3, 20,9% ao scFv 3-64, e 8,92% ao scFv 4-4. Enquanto para a variante Gama, foi observada ligação de 7,27%, 3,05% e 6,88% para os scFv 3-3, 3-64 e 4-4, respectivamente.

6.5 Identificação de epítomos dos anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2.

O mapeamento de epítomos, como discutido anteriormente, é o processo de identificação dos locais específicos na proteína do vírus (ou outra molécula), que são reconhecidos pelo sistema imunológico humano e desencadeiam uma resposta imune. No contexto do SARS-CoV-2, o mapeamento de epítomos ajudou a identificar regiões específicas da proteína Spike do vírus que podem ser alvos para as vacinas ou para o desenvolvimento de terapias antivirais. Em outras palavras, o mapeamento permite entender e representar como as variantes do SARS-CoV-2 afetam a resposta imunológica. Compreender como a ligação do anticorpo pode se converter em imunidade protetora adquirida por infecção ou vacinação anteriores requer a identificação dos epítomos, ou regiões no antígeno onde os anticorpos se ligam. Os epítomos de anticorpos neutralizantes têm sido e continuam a ser uma área focal importante para o desenho de vacinas e anticorpos terapêuticos.

Um dos objetivos de diferenciar com precisão os sítios do epítopo é fornecer informações sobre as características e propriedades dos anticorpos que se ligam a cada subsítio, como o uso da linhagem germinativa, a suscetibilidade à mutação, onde os anticorpos de próxima geração deve ser direcionados e qual é a melhor combinação de anticorpos como meio terapêutico. A combinação de anticorpos que têm como alvo difetentes epítomos, têm sido combinados para limitar a possibilidade de que mutações de escape do vírus fizessem o tratamento ineficiente (BAUM et al., 2020; KOENIG et al., 2021).

O mapeamento de epítomos pode ser feito usando uma variedade de técnicas. Neste trabalho foram usados ensaios de ligação direta por Dot-Blot dos anticorpos a diferentes peptídeos, contendo sequências truncadas da proteína Spike. Assim é possível aportar informação das ligações aos possíveis epítomos específicos onde essas ligações estão acontecendo com maior intensidade em nossos anticorpos. Existem resultados de mapeamentos que permitem identificar vários epítomos do SARS-CoV-2, incluindo

aqueles que são reconhecidos pelos anticorpos produzidos por indivíduos que se recuperaram da COVID-19 (YAN et al, 2020; LAN et al, 2020; LI et al, 2020).

A determinação dos epítomos lineares imunogênicos foi realizada pela imobilização dos peptídeos contendo diferentes sequências sobrepostas da proteína Spike da sequência do RBD, com um painel de peptídeos de 17 resíduos de aminoácidos sobrepostos obtidos de BEI Resources (NR-52402). Empregamos o ensaio de imunodeteção por Dot-Blot para determinar os epítomos reconhecidos pelos scFvs recombinantes. As proteínas truncadas ou peptídeos sintéticos pertencentes ao SARS-Cov-2 foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose (NC) e detectadas com os scFvs. Foi usado um controle negativo de sequências de epítomos que não pertencem a proteína Spike, e como positivo os anticorpos conjugados à estreptavidina.

Conforme revelado nos resultados do SDS-PAGE, as seis proteínas recombinantes foram expressas e purificadas com sucesso (Figura 13 e 14). De acordo com os resultados dos ensaios de Dot-Blot, os anticorpos reagiram em maior frequência a diferentes peptídeos representados em escala de cinzas no gráfico 1 e figura 15, sugerindo que os scFvs reconheceram principalmente estas sequências do SARS-CoV-2.

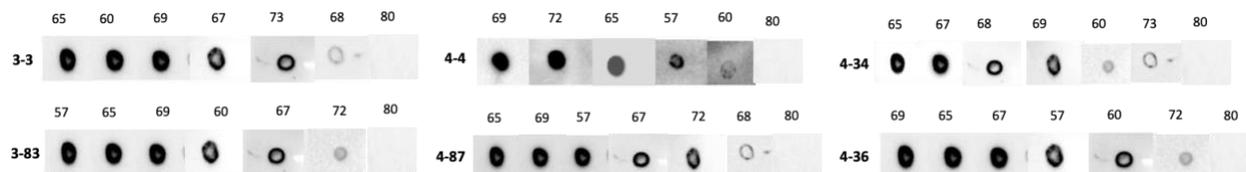


Figura 15. Mapeamento de epítomos.

Ensaio de imunoblotting por Dot-Blot para determinar os epítomos reconhecidos pelos mAbs, usando [NR-52402 Peptide Array, SARS-Related Coronavirus 2 Spike (S) Glycoprotein (Peptides and Peptide Arrays)].

Para obter os valores de escala de cinza foi utilizado o *software* Image J. A intensidade do valor observado menos a intensidade do controle, permitiu obter a intensidade real da ligação dos anticorpos a cada um dos peptídeos e suas sequências determinadas. A escala do pixel é de 0 a 250, onde 0 é branco, e 250 é o preto máximo detectado pelo *software* Image J.

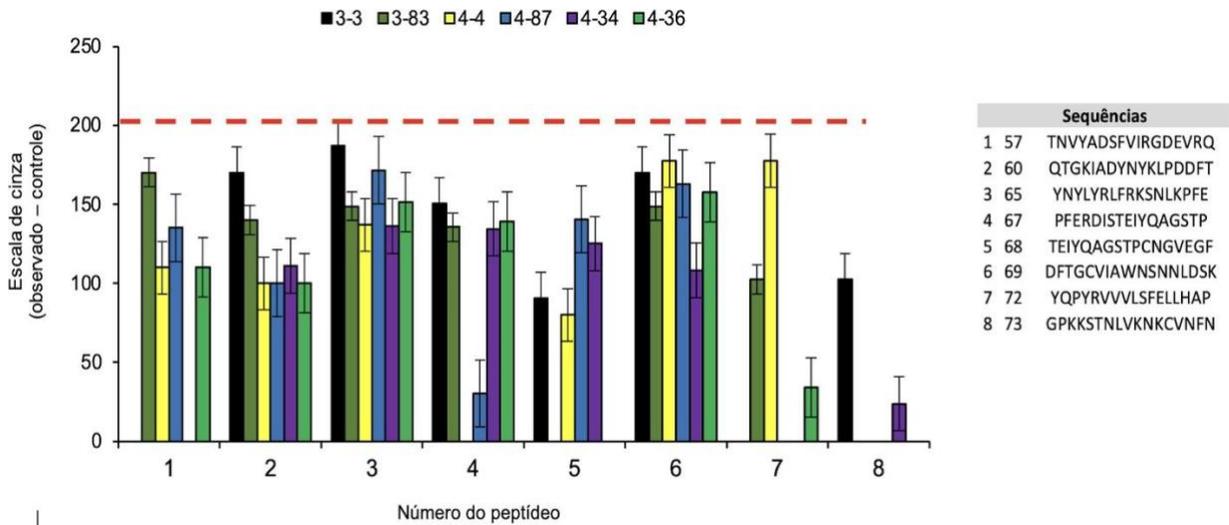


Gráfico 1. Intensidade de ligação em escala de cinzas (0 a 250 pixels).

Caracterização da ligação dos scFvs as sequências em relação aos controles. Eixo X peptídeos numerados de 1 a 8, eixo Y intensidade da ligação. A linha tracejada em vermelho representa o valor numérico que indica a intensidade máxima da ligação possível do anticorpo aos peptídeos de 1 a 8.

Os números 1, 2, 3, 6 e 7, correspondentes aos peptídeos 57, 60, 65, 69 e 72 foram os que demonstraram maior intensidade de ligação. É importante destacar que nesses peptídeos encontram-se os resíduos K417, F456, Y421, L455, Y489, F486, Q493, que contribuem extensivamente para a superfície de ligação e interação com anticorpos neutralizantes, como discutido por Wu et al (2020), Yuan et al (2020), Yan et al (2020).

Como mencionado anteriormente, os seis scFvs reúnem os dois motivos descritos como cruciais na linha germinativa IGHV3-53/3-66 para a ligação ao RBD consistentes em um motivo NY em resíduos VH 37 e 38 no CDR H1 e um motivo SGGS em resíduos VH 58 a 64 no CDR H2. Conforme discutido por Yan et al (2020) o motivo NY nos seis scFvs é relevante na ligação aos epítomos encontrados porque a cadeia lateral de N32 no VH no motivo NY hidrogênio se une com o grupo carbonilo do resíduo A475 no RBD, e essa interação é estabilizada por uma extensa rede de ligações de hidrogênio com outros resíduos do anticorpo, bem como uma molécula de água ligada. Esses contatos polares não apenas aumentam a interação RBD-scFv, mas também estabilizam as conformações do CDR com os resíduos circundantes. O motivo NY insere-se na estrutura

hidrofóbica formada pelos resíduos Y421, F456 e L455 do RBD e o componente alifático de K417, concordando com nossos achados (Tabela 12).

O motivo SGGG, relevante em CDR H2 por formar uma extensa rede de pontes de hidrogênio com o RBD (Yan et al 2020), inclui quatro ligações de hidrogênio que envolvem as cadeias laterais de hidroxilo de S58 e S64 do VH e quatro ligações de hidrogênio mediadas por água para o grupo carbonilo principal de G59 do VH, a amida principal de S64 do VH e a cadeia lateral de S64 do VH. Junto com Y57 do VH, o motivo SGGG participa de uma volta beta tipo I, com um ângulo Φ positivo para G63 do VH no final da volta (YAN et al, 2020). É possível hipotetizar que nossos scFvs se comportam e se ligam da mesma forma.

Nos nossos experimentos, conseguimos identificar que os scFvs 3-3, 3-83, 4-34, 4-87, 4-4 e 4-36 se ligam a epítomos semelhantes dos anticorpos como YB9-258, COVA2-04, BD56-423, COVOX-158, WIBP-2B11, que se sobrepõem ao sítio de ligação de ACE2. O RBD na conformação *up* expõe o sítio de ligação do receptor e se liga ao ACE2 em afinidades nano molares no tipo selvagem e em diferentes variantes de SARS-CoV-2 identificadas (HAN et al., 2022; MANNAR et al., 2022; YUAN et al., 2020b).

Nossos scFvs são anticorpos neutralizantes Classe 1, ou seja, de competição direta da ligação de ACE2 com o RBDs *up*. Como é conhecido, a grande maioria dos nAbs Classe 1 são codificados pelos segmentos gênicos VH3-53 ou VH3-63, e seu envolvimento com o sítio de ligação ACE2 nos RBDs é dominado por CDRH1 e CDRH2, enquanto um *loop* CDRH3 mais curto (menos de 15 aminoácidos), faz menos interações com o sítio de ligação de ACE2 nos RBDs. Ressalta-se que as orientações de ligação destes anticorpos são compatíveis apenas com os RBDs *up* e, devido à oclusão completa da interface de ligação ACE2, não são permitidas interações com os RBDs *down* (DEJNIRATTISAI et al., 2021; MUECKSCH et al., 2021).

Diversos anticorpos IGHV3-53 se ligam ao sítio de ligação ACE2 no SARS-CoV-2 RBD de maneira semelhante, mas com um K_d de 70,1 nM (WU et al., 2020c) sendo possível pensar que os nossos se comportam da mesma forma. Semelhante ao sítio de ligação de ACE2 (YAN et al., 2020) os epítomos desses anticorpos só podem ser acessados quando o RBD está na conformação *up*. A partir de que os scFv 3-3 e 4-34 são parecidos ao anticorpo CC12.3 identificado por Yuan et al (2020), com a mesma combinação IGHV3-53 IGKV3-20, poderia se reafirmar que estes anticorpos poderiam atingir o mesmo local de ligação de ACE2 do SARS-CoV-2 RBD. No entanto, a identidade da cadeia leve não parece ser tão importante quanto a cadeia pesada (YUAN et al., 2020). Na literatura aparece referência de nove cadeias leves distintas identificadas entre os anticorpos IGHV3-53 direcionados a RBD, sendo IGKV1-9 e IGKV3-20 os mais frequentemente detetados até a atualidade (WU et al., 2020c; YAN et al., 2020).

Como os epítomos desses anticorpos IGHV3-53 são bastante planos, com apenas um pequeno espaço para inserir seu *loop* CDRH3, os CDRH3s mais longos não podem ser acomodados. Outro trabalho recente encontrou uma conclusão semelhante, relatando que os anticorpos direcionados ao RBD de SARS-CoV-2 codificados por IGHV3-53 ou IGHV3-66 tinham uma CDRH3 curta (BARNES et al., 2020; BRINEY et al., 2019; JARDINE et al., 2015). Assim, uma das características moleculares da resposta do anticorpo codificado por IGHV3-53 ao SARS-CoV-2 RBD é uma CDRH3 curta.

A partir de análise de similaridade com os anticorpos previamente descritos, os scFvs 3-3 e 3-83 podem se ligar ao RBD somente quando estão na conformação *up* na proteína

S trimérica. Isto é congruente com o destacado por (WALLS et al., 2020; WRAPP et al., 2020). Da mesma forma, o scFv 3-34 deve usar principalmente a cadeia leve para interagir com a superfície plana do sítio de ligação de ACE2 e a cadeia pesada com a cresta RBD, como descrito por (WU et al., 2020a). Em consequência, se liga ao lado da cresta. Este modo de ligação é muito semelhante aos anticorpos IGHV3-53 previamente caracterizados com uma CDRH3 curta (Figura 16) como nossos seis anticorpos, onde as interações com o RBD são dominadas pela cadeia pesada (BARNES et al., 2020; WU et al., 2020a; YUAN et al., 2020b).

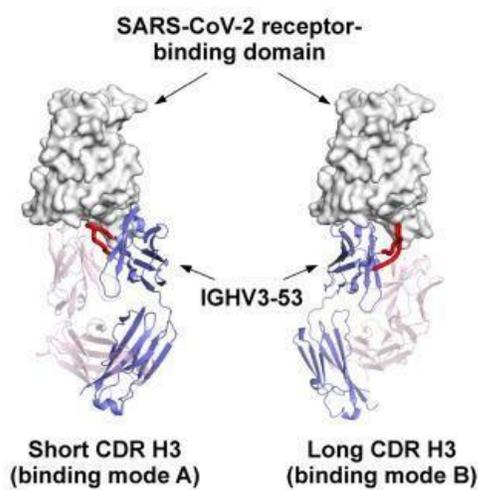


Figura 16. Desenho tridimensional dos modos A e B de domínio de ligação ao receptor SARS-Cov- 2.

Fonte: (WU et al., 2020a)

Os epítomos mais relevantes de anticorpos neutralizantes estão no RBD e, em menor extensão, no NTD (ANDREANO et al., 2021; BROUWER et al., 2020; DEJNIRATTISAI et al., 2021; DUSSUPT et al., 2021; HAN et al., 2022; ROGERS et al., 2020; ZOST et al., 2020). Dentro do RBD, a maioria dos anticorpos neutralizantes tem como alvo ou liga-se próximo ao RBS, o sítio de ligação do receptor ACE2. Como o Spike precisa expor seu RBS para se ligar ao ACE2, essa exposição também pode levar ao reconhecimento do RBS por anticorpos no sistema imunológico. O RBS tem uma superfície relativamente grande e pode ser alvo de anticorpos que se aproximam do RBS em vários ângulos e interagem com diferentes partes do RBS. Esses anticorpos podem ser agrupados em quatro subgrupos principais (RBS-A a D) com base em sua preferência de epítopo, conforme proposto anteriormente. Locais de ligação no RBD além do RBS também foram

identificados (LIU; WILSON, 2022). Resíduos no RBD, como Y505, Q493, F456, K417, Y489, A475 e F486, são resíduos de epítomos essenciais, que contribuem extensivamente para a superfície de ligação e interação com anticorpos neutralizantes (Wu et al, 2020). Os resíduos do epítomo de nossos scFvs agrupam-se na região que corresponde aproximadamente ao subsítio alvo do anticorpo no RBS-A (resíduos 400-425, 444-460 e 473-506, exceto 479-483), epítomos reconhecidos pelos nossos anticorpos, podendo hipotetizar que nossos scFvs se ligam a peptídeos que contêm os resíduos que caracterizam a região de ligação RBS-A quando o RBD está na conformação *up*.

7 CONCLUSÕES

Embora vários estudos tenham identificado IGHV3-53/3-66 como uma linhagem germinativa comum para anticorpos SARS-CoV-2 RBD (BARNES et al., 2020; CAO et al., 2020; WU et al., 2020a; YUAN et al., 2020b) os requisitos específicos de sequência para produzir um anticorpo IGHV3-53/3-66 para o RBD de SARS-CoV-2 permanecem em certa medida desconhecidos. A caracterização completa da sequência de anticorpos RBD está disponível como resultado de esforços de diversas organizações em isolar anticorpos RBD e relatar suas sequências (DU et al., 2020; YUAN et al., 2020a). Na pesquisa desenvolvida como parte desta tese de doutorado, produzimos, purificamos, e caracterizamos sequências distintas de seis anticorpos de classe 1, clonótipo 2 IGHV3-53/3-66, com alvo no RBD, usando ensaios de ligação por citometria de fluxo, análise de sequência, e mapeamento de epítomos.

Nossos resultados reafirmam que os anticorpos IGHV3-53/3-66 fornecem uma base estável para gerar clonótipos públicos com CDRH3 curtas. O estudo de clonótipos desenvolvido permite a compreensão mais completa da compatibilidade entre a sequência do CDRH3 e a identidade da cadeia pesada na linhagem germinal IGHV3-53/3-66. Descobrimos que nossos anticorpos obtidos de indivíduos convalescentes infectados com SARS-CoV2_WT, foram capazes de se ligar a uma das variantes de SARS-CoV-2 que mais causaram mortes no Brasil, a Delta, e reagir de forma cruzada com algumas variantes e sub variantes de Ômicron. As mutações de Ômicron podem ter tornado as ligações de nossos anticorpos menos fortes a suas sub variantes. Anticorpos que se ligam ao RBD de pacientes convalescentes com SARS-CoV-2 têm consideravelmente mais hipermutações somáticas (GAEBLER et al., 2021). Como resultado, embora os anticorpos IGHV3-53/3-66-RBD não exijam hipermutação somática para neutralizar o SARS-CoV-2. As análises revelaram que as hipermutações somáticas nos scFvs 3-3, 3-83 e 4- 34 podem desempenhar um papel importante na capacidade de ligação e neutralização das variantes e sub variantes de Ômicron; possivelmente tornando estes anticorpos

resistentes ao escape e a substituições previamente demonstradas como particularmente eficazes na evasão de anticorpos VH3-53/VH3-66. A realização constante de ensaios para novas variantes é necessária para avaliação do potencial terapêutico desses anticorpos. Assim, a citometria de fluxo, conforme descrita neste estudo, mostrou ser um método útil para caracterizar e descrever as ligações entre nossos anticorpos e algumas das diferentes variantes que circularam no Brasil ao longo da pandemia de COVID-19.

Através dos ensaios de mapeamento por Dot-Blot, definimos que nossos anticorpos se dirigem a múltiplos locais de vulnerabilidade no RBD. Isso é consistente com a identificação de vários locais antigênicos no RBD de SARS-CoV-2. No geral, o RBD é altamente imunogênico, pois tanto a infecção por SARS-CoV-2 quanto a vacinação provocam fortes respostas de anticorpos ao RBD. Nossos anticorpos direcionados ao RBS no RBD se ligam com afinidade suficiente em locais específicos, competindo com a ligação a ACE2. De fato, numerosas investigações de anticorpos revelaram que os anticorpos mais eficazes visam especificamente o RBS.

Um dos objetivos de diferenciar com precisão os locais do epítipo é informar sobre as características e propriedades dos anticorpos que se unem a cada subsítio, incluindo o uso da linha germinal, a suscetibilidade às mutações, onde as vacinas de próxima geração deve ser direcionadas e qual seria a melhor combinação de anticorpos como terapia. Anticorpos que se dirigem a diferentes epítipos podem reduzir a possibilidade de evasão por mutações de escape durante o tratamento com anticorpos. Nossos resultados do mapeamento são coerentes com os de (BARNES et al., 2020; CAO et al., 2022; DEJNIRATTISAI et al., 2021), que se baseiam na conformação de Spike (RBD para *up*), nas mutações de escape e na competição de anticorpos.

Apesar da grande quantidade de anticorpos neutralizantes que estão sendo identificados atualmente (ANDREANO et al., 2021; BROUWER et al., 2020; CAO et al., 2022; JU et al., 2020b; KREER et al., 2020; ROBBIANI et al., 2020; ROGERS et al., 2020), o SARS-CoV-2 pode eventualmente se tornar endêmico dentro da população humana surgindo mutações de escape como as que temos visto. As informações

produzidas nesta pesquisa podem ser aproveitadas para modificar ou melhorar os projetos de vacinas e de biofármacos existentes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, A. et al. SARS-CoV-2 Ómicron : evasion of potent humoral responses and resistance to clinical immunotherapeutics relative to viral variants of concern. **medRxiv**, v. 61, n. 02, 2021.
- AHMAD, T. A.; EWEIDA, A. E.; SHEWEITA, S. A. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. **Trials in Vaccinology**, v. 5, p. 71–83, 1 jan. 2016.
- AHMED, S. F.; QUADEER, A. A.; MCKAY, M. R. **Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies**. **Viruses**, 2020.
- ANDREANO, E. et al. Extremely potent human monoclonal antibodies from COVID-19 convalescent patients. **Cell**, v. 184, n. 7, 2021.
- BARNES, C. O. et al. Structures of Human Antibodies Bound to SARS-CoV-2 Spike Reveal Common Epitopes and Recurrent Features of Antibodies. **Cell**, v. 182, n. 4, 2020.
- BAUM, A. et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 Spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. **Science**, v. 369, n. 6506, 2020.
- BOSWELL, K. L. et al. Characterization and epitope mapping of SARS-CoV-2-specific t cells. **Topics in Antiviral Medicine**, p. 31, 2021.
- BOYD, S. D. et al. Individual Variation in the Germline Ig Gene Repertoire Inferred from Variable Region Gene Rearrangements. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, 2010.
- BRINEY, B. et al. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. **Nature**, v. 566, n. 7744, 2019.
- BROUWER, P. J. M. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 643–650, 2020.
- CALLAWAY, E. Heavily mutated Ómicron variant puts scientists on alert. **Nature**, v. 600, n. 7887, p. 21, 2021.
- CAMERINI, D. et al. Mapping SARS-CoV-2 Antibody Epitopes in COVID-19 Patients with a Multi- Coronavirus Protein Microarray. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, 2021.
- CAMERONI, E. et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Ómicron antigenic shift. **Nature**, 2021.
- CAO, Y. et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. **Cell**, v. 182, n. 1, 2020.
- CAO, Y. et al. BA. 2.12. 1, BA. 4 and BA. 5 escape antibodies elicited by Ómicron infection. **Nature**, v. 608, n. 7923, p. 593–602, 2022.

CASCELLA, M. et al. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **Statpearls [internet]**, 2022.

CHEN, E. C. et al. Convergent antibody responses to the SARS-CoV-2 Spike protein in convalescent and vaccinated individuals. **Cell Reports**, v. 36, n. 8, 2021.

CHEN, J. et al. Ómicron variant (B. 1.1. 529): infectivity, vaccine breakthrough, and antibody resistance. **Journal of chemical information and modeling**, v. 62, n. 2, p. 412–422, 2022.

CHENG, S. M. S. et al. Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Ómicron variant BA. 1 following homologous and heterologous CoronaVac or BNT162b2 vaccination. **Nature medicine**, v. 28, n. 3, p. 486–489, 2022.

COVID Data Tracker. Centers for Disease Control and Prevention.. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2023, November 20. <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker>

CRUSE, J. M. et al. Antigens, immunogens, vaccines, and immunization. **Atlas of Immunology**, p. 59–76, 1999.

DAVIES, N. G. et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England. **Science**, v. 372, n. 6538, p. eabg3055, 2021.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Antibody evasion by the P. 1 strain of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 184, n. 11, p. 2939–2954, 2021.

DHAWAN, M. et al. Ómicron variant (B.1.1.529) and its sublineages: What do we know so far amid the emergence of recombinant variants of SARS-CoV-2? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2022.

DU, S. et al. Structurally Resolved SARS-CoV-2 Antibody Shows High Efficacy in Severely Infected Hamsters and Provides a Potent Cocktail Pairing Strategy. **Cell**, v. 183, n. 4, 2020.

DUSSUPT, V. et al. Low-dose in vivo protection and neutralization across SARS-CoV-2 variants by monoclonal antibody combinations. **Nature Immunology**, v. 22, n. 12, 2021.

FAGIANI, F.; CATANZARO, M.; LANNI, C. **Molecular features of IGHV3-53-encoded antibodies elicited by SARS-CoV-2. Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2020.

FARIA, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P. 1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, v. 372, n. 6544, p. 815–821, 2021.

FARRERA-SOLER, L. et al. Identification of immunodominant linear epitopes from SARS-CoV-2 patient plasma. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238089, 9 set. 2020.

GAEBLER, C. et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. **Nature**, v. 591, n. 7851, 2021.

GALLOWAY, S. E. et al. 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.

GAO, X. et al. Binding and neutralizing abilities of antibodies towards SARS-CoV-2 S2 domain. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1–11, 13 abr. 2022.

GOIKE, J. et al. Synthetic repertoires derived from convalescent COVID-19 patients enable discovery of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and a novel quaternary binding modality. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 2021.

GROOTHUIS, J. R. et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 21, p. 1524–1530, 1993.

GU, H. et al. Probable transmission of SARS-CoV-2 Ômicron variant in quarantine hotel, Hong Kong, China, November 2021. **Emerging infectious diseases**, v. 28, n. 2, p. 460, 2022.

HAMED, S. M. et al. State of the art in epitope mapping and opportunities in COVID-19. **Future Science OA**, v. 9, n. 1, p. FSO832, 1 jan. 2023.

HAN, P. et al. Receptor binding and complex structures of human ACE2 to Spike RBD from Ômicron and delta SARS-CoV-2. **Cell**, v. 185, n. 4, p. 630–640, 2022.

HAN, X. et al. A Rapid and Efficient Screening System for Neutralizing Antibodies and Its Application for SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

HANSEN, J. et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. **Science**, v. 369, n. 6506, p. 1010–1014, 2020.

HARDER, T. et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 infection with the Delta (B. 1.617. 2) variant: second interim results of a living systematic review and meta-analysis, 1 January to 25 August 2021. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 41, p. 2100920, 2021.

HAYNES, W. A. et al. High-resolution epitope mapping and characterization of SARS-CoV-2 antibodies in large cohorts of subjects with COVID-19. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 2021.

HEIDPRIEM, J. et al. Longitudinal development of antibody responses in covid-19 patients of different severity with elisa, peptide, and glycan arrays: An immunological case series. **Pathogens**, v. 10, n. 4, 2021.

HENDREN, N. S. et al. Description and Proposed Management of the Acute COVID-19 Cardiovascular Syndrome. **Circulation**, v. 141, n. 23, p. 1903–1914, 9 jun. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, 2020.

HOFFMANN, M. et al. The Ómicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. **Cell**, v. 185, n. 3, 2022.

HUANG, J.; HONDA, W. CED: A conformational epitope database. **BMC Immunology**, v. 7, 2006.

HUNG, I. F. N. et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 4, p. 447–456, 2011.

HWANG, Y.-C. et al. Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. **Journal of Biomedical Science**, v. 29, n. 1, p. 1–50, 2022.

JARDINE, J. G. et al. Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. **Science**, v. 349, n. 6244, 2015.

JIANG, S.; HILLYER, C.; DU, L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 5, p. 355–359, 1 maio 2020.

JU, B. et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 584, n. 7819, p. 115–119, 2020a.

JU, B. et al. Potent human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection Advanced Innovation Center for Structural Biology, Beijing Frontier Research. **bioRxiv**, 2020b.

KARIM, S. S. A.; KARIM, Q. A. Ómicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. **The lancet**, v. 398, n. 10317, p. 2126–2128, 2021.

KO, J.-H. et al. Challenges of Convalescent Plasma Infusion Therapy in Middle East Respiratory Coronavirus Infection: A Single Centre Experience. **Antiviral Therapy**, v. 23, n. 7, p. 617–622, 1 out. 2017.

KOENIG, P. A. et al. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. **Science**, v. 371, n. 6530, 2021.

KREER, C. et al. Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. **Cell**, v. 182, n. 4, 2020.

KREYE, J. et al. A Therapeutic Non-self-reactive SARS-CoV-2 Antibody Protects from Lung Pathology in a COVID-19 Hamster Model. **Cell**, v. 183, n. 4, 2020.

KUMAR, S.; CHANDELE, A.; SHARMA, A. Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 9, p. e1009885, 3 set. 2021.

LAU, E. H. Y. et al. Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 63, 2021.

LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. [s.d.].

LIU, H.; WILSON, I. A. **Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. Immunological Reviews**, 2022.

LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 Spike. **Nature**, v. 584, n. 7821, 2020.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020.

LUŠTREK, M. et al. Epitope predictions indicate the presence of two distinct types of epitope-antibody-reactivities determined by epitope profiling of intravenous immunoglobulins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

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

MANNAR, D. et al. SARS-CoV-2 Ómicron variant: Antibody evasion and cryo-EM structure of Spike protein–ACE2 complex. **Science**, v. 375, n. 6582, 2022.

MARKOV, P. V et al. The evolution of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology** |, v. 21, p. 361–379, 2023.

MIELKE, D. et al. Development of flow cytometry-based assays to assess the ability of antibodies to bind to SARS-CoV-2-infected and Spike-transfected cells and mediate NK cell degranulation. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 6, p. 483–496, 2022.

MITTAL, A.; KHATTRI, A.; VERMA, V. Structural and antigenic variations in the Spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 2, p. e1010260, 2022.

MIYAMOTO, S. et al. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Ómicron after breakthrough infection by other variants. **Med**, v. 3, n. 4, 2022.

MOHAPATRA, R. K. et al. **The recently emerged BA.4 and BA.5 lineages of Ómicron and their global health concerns amid the ongoing wave of COVID-19 pandemic – Correspondence. International Journal of Surgery**, 2022.

MUECKSCH, F. et al. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations. **Immunity**, v. 54, n. 8, 2021.

MUNRO, A. P. S. et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. **The Lancet**, v. 398, n. 10318, p. 2258–2276, 2021.

NATHAN, R. et al. 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.

OLIVERA-UGARTE, S.-M. et al. A nanoparticle-based COVID-19 vaccine candidate elicits broad neutralizing antibodies and protects against SARS-CoV-2 infection. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 44, p. 102584, 2022.

PIERCE, J. D. et al. Post-COVID-19 Syndrome. **Nursing Research**, v. 71, n. 2, 2022.

PINTO, D. et al. Structural and functional analysis of a potent sarbecovirus neutralizing antibody. **BioRxiv**, p. 2004–2020, 2020.

PLANAS, D. et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Ómicron to antibody neutralization. **Nature**, v. 602, n. 7898, 2022.

POLACK, F. P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. **New England journal of medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 2020.

RIASCO PALACIOS, J. F. **Produção de novos anticorpos Anti-CD20 na forma de FvFc em células de mamíferos**. [s.l.: s.n.].

ROBBIANI, D. F. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 437–442, 2020.

ROGERS, T. F. et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. **Science**, v. 369, n. 6506, p. 956–963, 2020.

RYSZEWSKA, A.; NIEWIADOMSKI, P. Does SARS-CoV-2 infect cardiomyocytes directly? Yes, it does. **Medical Research Journal**, v. 6, n. 3, p. 237–244, 2021.

SAHR, F. et al. Evaluation of convalescent whole blood for treating Ebola Virus Disease in Freetown, Sierra Leone. **Journal of Infection**, v. 74, n. 3, p. 302–309, 2017.

SANCHEZ-TRINCADO, J. L.; GOMEZ-PEROSANZ, M.; RECHE, P. A. Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

SANDERS, R. W. et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003618, 2013.

SCHULZ, S. R. et al. Augmented neutralization of SARS-CoV-2 Ómicron variant by boost vaccination and monoclonal antibodies. **European Journal of Immunology**, v. 52, n. 6, 2022.

SELVAVINAYAGAM, S. T. et al. Novel Mutations in XBB Variants of SARS-CoV-2 Decipher High Rates of Morbidity Among COVID-19 Patients in South India. 2023.

SHANG, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, 2020.

SHI, R. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 584, n. 7819, 2020.

SINGH, D. D. et al. SARS-CoV-2: Recent Variants and Clinical Efficacy of Antibody-Based Therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 85, 14 fev. 2022.

SONG, W. et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus Spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 8, p. e1007236, 2018.

TAN, T. J. C. et al. Sequence signatures of two public antibody clonotypes that bind SARS-CoV-2 receptor binding domain. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

TANG, X.-C. et al. Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. E2018–E2026, 2014.

TAYLOR, P. C. et al. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 6, p. 382–393, 2021.

TEGALLY, H. et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, 2021.

TIAN, X. et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus Spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 382–385, 2020.

VAUGHAN, A. **Ômicron emerges**. Elsevier, , 2021.

VOLZ, E. et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England. **Nature**, v. 593, n. 7858, p. 266–269, 2021.

WALENSKY, R. P.; WALKE, H. T.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 variants of concern in the United States—challenges and opportunities. **Jama**, v. 325, n. 11, p. 1037–1038, 2021.

WALLS, A. C. et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 1026–1039, 2019.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 abr. 2020.

WAN, J. et al. Human-IgG-neutralizing monoclonal antibodies block the SARS-CoV-2 infection. **Cell Reports**, v. 32, n. 3, p. 107918, 2020.

WANG, C. et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020a.

WANG, P. et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P. 1 to antibody neutralization. **Cell host & microbe**, v. 29, n. 5, p. 747–751, 2021.

WANG, Q. et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894- 904.e9, 14 maio 2020b.

WANG, X. et al. A potent human monoclonal antibody with pan-neutralizing activities directly dislocates S trimer of SARS-CoV-2 through binding both up and down forms of RBD. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

WEI, X.; LI, X.; CUI, J. **Evolutionary perspectives on novel coronaviruses identified in pneumonia cases in China. National Science Review**, 2020. Disponível em: <<https://www.>>

WESTENDORF, K. et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. **Cell Reports**, v. 39, n. 7, p. 110812, 2022.

WIDYASARI, K.; KIM, J. A Review of the Currently Available Antibody Therapy for the Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Antibodies**, v. 12, n. 1, 2023.

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

WU, N. C. et al. In vitro evolution of an influenza broadly neutralizing antibody is modulated by hemagglutinin receptor specificity. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

WU, N. C. et al. An Alternative Binding Mode of IGHV3-53 Antibodies to the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain. **Cell Reports**, v. 33, n. 3, p. 108274, 20 out. 2020a.

WU, Y. et al. Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 6, p. 891- 898.e5, 2020b.

WU, Y. et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. **Science**, v. 368, n. 6496, p. 1274–1278, 12 jun. 2020c.

XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International journal of oral science**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2020.

YAN, Q. et al. Germline IGHV3-53-encoded RBD-targeting neutralizing antibodies are commonly present in the antibody repertoires of COVID-19 patients. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, 2021.

YAN, R. et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**, v. 367, n. 6485, 2020.

YANG, X.; YU, X. **An introduction to epitope prediction methods and software. Reviews in Medical Virology**, 2009.

YAO, H. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. **Cell**, v. 183, n. 3, p. 730- 738.e13, 2020.

YEH, K.-M. et al. Experience of using convalescent plasma for severe acute respiratory syndrome among healthcare workers in a Taiwan hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 919–922, 1 nov. 2005.

YU, L.; GUAN, Y. **Immunologic basis for long HCDR3s in broadly neutralizing antibodies against HIV-1. Frontiers in Immunology**, 2014.

YUAN, M. et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV- 2 and SARS-CoV. **Science**, v. 368, n. 6491, p. 630–633, 2020a.

YUAN, M. et al. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. **Science**, v. 369, n. 6507, p. 1119–1123, 28 ago. 2020b.

YUE, C. et al. Enhanced transmissibility of XBB. 1.5 is contributed by both strong ACE2 binding and antibody evasion. **bioRxiv**, p. 2001–2023, 2023.

ZATTONI, I et al. Uso da citometria de fluxo no diagnóstico sorológico da COVID-19. **RBAC**, v. 53, n. 2, p. 138–142, 2021.

ZHANG, J. S. et al. **A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera. Journal of Medical Virology**, 2005.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 3 fev. 2020.

ZOST, S. J. et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 443–449, 2020

9 ANEXOS I



Faculdade de Medicina

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “Anticorpos na terapia da Covid-19: estudo clínico de fase IIa com plasma de convalescentes e geração anticorpos monoclonais humanos”, sob a responsabilidade do pesquisador André Moraes Nicola. Este é um projeto que envolve pesquisadores e profissionais de saúde da Universidade de Brasília, Fundação Hemocentro de Brasília e de diversos hospitais do Distrito Federal.

O projeto tem como objetivo avaliar se uma nova forma de tratar a doença causada pelo novo coronavírus (Covid-19) funciona em pessoas internadas em hospital. Esse tratamento será feito com a parte líquida do sangue(plasma) de pessoas convalescentes, que são aquelas que tiveram a doença e se curaram. Além disso, uma amostra do seu sangue será utilizada para pesquisa científica em laboratório para gerar anticorpos monoclonais contra o coronavírus, que são substâncias criadas em laboratório para diagnóstico e tratamento da Covid-19.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará em duas etapas diferentes. A primeira será realizada hoje, caso o(a) senhor(a) concorde em participar, e tem como objetivo saber se a coleta do seu plasma é segura para o(a) senhor(a) e para quem o receber depois. Para isso, o(a) senhor(a) responderá a algumas perguntas e depois coletaremos até cinco tubos de 5 a 8 ml cada do seu sangue e um swab do nariz, um exame em que um material parecido com um cotonete será inserido em seu nariz para confirmar que o(a) senhor(a) não tem mais o coronavírus. O tempo estimado para essa entrevista de seleção, incluindo coleta dos exames, é de 40 minutos.

A segunda etapa de sua participação dependerá dos resultados desta conversa e exames. Em caso positivo, o Hemocentro de Brasília entrará em contato com o(a) senhor(a) para marcar uma data para a coleta de plasma no Hemocentro. Esta coleta começa com uma triagem, momento em que um profissional de saúde fará perguntas para saber se o(a) senhor(a) se encaixa nas exigências legais de doação de sangue. Em seguida, serão coletados dois tubos de 5 a 8 ml cada de sangue para exames. Por fim, entre 500 e 600 ml do seu plasma serão coletados por um procedimento chamado plasmaferese. Esse procedimento, semelhante à doação de sangue, é feito rotineiramente no Hemocentro de Brasília e começa com um pequeno furo em sua veia. Seu sangue circulará então dentro de uma tubulação estéril e de uso único por uma máquina, que retira um pouco da parte

líquida do sangue (plasma) e depois devolve todo o resto para seu corpo. O tempo estimado para realização desta etapa é de duas horas.

Na primeira etapa, os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são de dor ou sangramentos no local da coleta de sangue ou dor e machucados no nariz durante a coleta do swab. Esses riscos serão minimizados pela coleta ser feita por profissional de saúde treinado e com experiência nesses procedimentos. Já na segunda etapa, os riscos são inerentes a qualquer procedimento de doação de sangue, como a dor, inflamação da veia (flebite) ou sangramentos no local da coleta de sangue ou queda de pressão, tonturas e desmaios durante a coleta de plasma. Esses riscos serão minimizados pela realização da plasmaférese no Hemocentro de Brasília, que conta com equipe treinada e infraestrutura para lidar com esses problemas. Se o(a) senhor(a) aceitar participar, contribuirá para o possível tratamento de pessoas que estão sofrendo com Covid-19, além de contribuir para pesquisas científicas em laboratório que podem resultar em novos tratamentos para essa e outras doenças.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento ou a fazer qualquer procedimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Todas as despesas que o(a) senhor(a) e seu acompanhante tiverem relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa (por exemplo transporte para o local da pesquisa, alimentação no local da pesquisa ou exames para realização da pesquisa) serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, é garantido ao(à) senhor(a) assistência integral e gratuita a ser fornecida pelas instituições participantes da pesquisa pelo tempo que for necessário.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, na Fundação Hemocentro de Brasília e nos hospitais participantes, podendo ser publicados posteriormente. Os dados serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após cujo período serão destruídos. Durante a sua participação nesta pesquisa, serão feitas coletas do seu sangue e uma coleta de material de seu nariz. Algumas destas coletas são destinadas a exames em laboratório de análises clínicas e no Hemocentro. Ao final dos exames, estes materiais serão descartados ou armazenados para pesquisas futuras na Universidade de Brasília e Fundação Hemocentro de Brasília, caso o(a) senhor(a) autorize. Outra destas coletas é destinada exclusivamente a pesquisa científica, e este material será também armazenado na Universidade de Brasília para utilização em pesquisas futuras, caso o(a) senhor(a) autorize. Estas pesquisas têm como objetivo entender a doença Covid-19 e também gerar em laboratório anticorpos que possam ser usados para diagnosticar e tratar esta e outras doenças. Todo o material será armazenado na Universidade de Brasília por até dez anos, período após o qual será destruído. Só realizaremos novas pesquisas com suas amostras armazenadas diferentes da descrita aqui com sua autorização ou a de seu representante legal, a ser obtida futuramente e

com assinatura de novo TCLE, ou com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa caso não seja possível contactá-lo(a). O(a) senhor(a) ou seu representante legal podem a qualquer momento retirar o consentimento ao armazenamento de suas amostras. Para tanto, suas amostras lhe serão devolvidas ou destruídas caso o(a) senhor(a) ou seu representante legal encaminhem uma carta assinada para a Universidade de Brasília, aos cuidados dos pesquisadores.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com: André Moraes Nicola, pesquisador da Universidade de Brasília, telefone (61) 99261-9048, e-mail andre.nicola@gmail.com ou Alexandre Nonino, hematologista na Fundação Hemocentro de Brasília, telefone (61) 3327-4464, e-mail direx@fhb.df.gov.br. Todos os pesquisadores estão disponíveis inclusive para ligação a cobrar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP/FM) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidas pelo telefone

(61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br, horário de atendimento de 08:30hs às 12:30hs e de 14:30hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FM está localizado na Faculdade de Saúde/Faculdade de Medicina no 2º andar do prédio, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar do estudo e em ter suas amostras armazenadas para pesquisa científica, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias. Uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

Brasília, ____ de _____ de _____.

Nome e assinatura do Participante de Pesquisa

Brasília, ____ de _____ de _____.

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo 2

Os dados de identificação, data de coleta e resultado do teste de ELISA de anticorpos contra SARS-Cov-2 aparecem descritos na seguinte tabela:

#	Identificação	Coleta data	ELISA ratio	ELISA resultado
1	D2408	06/07/20	2,6	Positivo
2	D2607	24/06/20	4,54	Positivo
3	D2667	24/06/20	4,06	Positivo
4	D2207	15/07/20	6,74	Positivo
5	D2304	15/07/20	3,64	Positivo
6	D2430	24/06/20	7,1	Positivo
7	D1837	02/06/20	0,24	Negativo
8	D2240	22/06/20	5,79	Positivo
9	D2256	15/07/20	8,3	Positivo
10	D2426	15/07/20	7,47	Positivo
11	D2733	22/06/20	6,71	Positivo
12	D2496	22/06/20	6,45	Positivo
13	D1912	04/06/20	7,61	Positivo
14	D1398	04/06/20	3,94	Positivo
15	D1567	04/06/20	6,85	Positivo
16	D1289	02/06/20	6,69	Positivo
17	D1048	02/06/20	4,15	Positivo
18	D1832	02/06/20	6,69	Positivo
19	D2150	15/07/20	2,86	Positivo
20	D1179	15/07/20	0,2	Negativo
21	D2955	15/07/20	4,2	Positivo

22	D1168	-	4,21	Positivo
23	D1636	02/06/20	0,27	Negativo
24	D1269	02/06/20	5,13	Positivo
25	D1098	03/06/20	7,35	Positivo
26	D1235	03/06/20	3,82	Positivo
27	D1646	03/06/20	1,13	Positivo
28	D1096	03/06/20	3,08	Positivo
29	D1247	03/06/20	3,92	Positivo
30	D1335	03/06/20	2,85	Positivo
31	D1869	04/06/20	2,53	Positivo
32	D1265	06/20	0,8	Negativo
33	D1893	04/06/20	3,75	Positivo
34	D1268	04/06/20	0,29	Negativo
35	D1433	06/20	1,35	Positivo
36	D1065	06/20	3,56	Positivo
37	D1801	28/05/20	5,71	Positivo
38	D1822	28/05/20	6,45	Positivo
39	D1192	29/05/20	6,72	Positivo
40	D1751	28/05/20	6,24	Positivo
41	D1288	28/05/20	5,14	Positivo
42	D1426	29/05/20	3,32	Positivo
43	D1591	29/05/20	0,253	Negativo
44	D1076	01/06/20	2,14	Positivo
45	D1756	03/06/20	1,95	Positivo
46	D1989	06/20	4,94	Positivo

47	D1622	06/20	5,73	Positivo
48	D1017	06/20	-	
49	D1411	06/20	6,77	Positivo
50	D1820	06/20	6,48	Positivo
51	D1114	06/20	1,15	Positivo
52	D1374	22/06/20	2,15	Positivo
53	D1031	22/06/20	6,46	Positivo
54	D2276	22/06/20	2,57	Positivo
55	D2200	06/07/20	0,09	Negativo
56	D2165	06/07/20	2,32	Positivo
57	D2748	06/07/20	4,74	Positivo
58	D2658	06/07/20	6,26	Positivo
59	D2899	07/07/20	3,98	Positivo
60	D2930	07/07/20	3,97	Positivo
61	D2350	07/07/20	5,33	Positivo
62	D2645	08/07/20	4,23	Positivo
63	D2087	08/07/20	6,92	Positivo
64	D2490	08/07/20	3,17	Positivo
65	D2725	08/07/20	2,3	Positivo
66	D2972	08/07/20	0,14	Negativo
67	D2854	08/07/20	4,37	Positivo
68	D2226	09/07/20	2,81	Positivo
69	D2696	09/07/20	0,15	Negativo
70	D2441	-	0,7	Negativo
71	D2026	07/07/20	0,18	Negativo

72	D2072	09/07/20	0,08	Negativo
73	D2183	09/07/20	1,71	Positivo
74	D2814	10/07/20	1,23	Positivo
75	D2070	10/07/20	6,78	Positivo
76	D2198	10/07/20	4,89	Positivo
77	D2211	10/07/20	7,95	Positivo
78	D2261	10/07/20	0,08	Negativo
79	D2777	10/07/20	2,23	positivo