UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA ZULKIEVICZ ROGERIO

ESTABELECIMENTO DE FERRAMENTAS PARA EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS DIMÉRICOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS



### VANESSA ZULKIEVICZ ROGERIO

# ESTABELECIMENTO DE FERRAMENTAS PARA EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS DIMÉRICOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Coorientadora: Dra. Gisele Fernanda Assine Picchi Constante

CURITIBA 2022

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rogerio, Vanessa Zulkievicz Estabelecimento de ferramentas para expressão recombinante de antígenos e anticorpos diméricos em células de mamíferos / Vanessa Zulkievicz Rogerio. – Curitiba, 2022. 1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin. Coorientadora: Dra. Gisele Fernanda Assine Picchi Constante.

1. SARS-CoV-2. 2. Antígenos. 3. Anticorpos. 4. Técnicas e procedimentos diagnósticos. I. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. II. Picchi-Constante, Gisele Fernanda Assine. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR - 40001016007P8

### **TERMO DE APROVAÇÃO**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA ZULKIEVICZ ROGERIO** intitulada: **Estabelecimento de Ferramentas para Expressão Recombinante de Antígenos e Anticorpos Diméricos em Células de Mamíferos**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica 23/11/2022 11:35:32.0 NILSON IVO TONIN ZANCHIN Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 17/01/2023 17:29:30.0 SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 17/01/2023 10:46:41.0 LETUSA ALBRECHT Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu esposo Fábio por acreditar em mim, por sempre me incentivar e apoiar, por todo companheirismo e compreensão durante esta trajetória. Aos meus pais Sidney e Irene que sempre batalharam para que os filhos pudessem estudar. Aos meus irmãos Sidney Junior e Bruna por todo apoio e carinho. Aos meus familiares e amigos pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador Dr. Nilson Zanchin pela oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos. À minha orientadora Dra. Gisele Picchi Constante pelos ensinamentos, parceria e por ser a minha maior incentivadora no âmbito acadêmico.

À Dra Carolina Camargo de Oliveira, que participou do acompanhamento deste trabalho, à Dra Sheila Maria Brochado Winnischofer e à Dra Letusa Albrecht, que participaram da banca de avaliação, agradeço pelas sugestões que ajudaram a enriquecer este trabalho.

À Dra Beatriz Guimarães, Dra Priscila Hiraiwa e Dra Eloise Slompo que sempre estiveram dispostas a ajudar, ensinar e contribuir com os experimentos, em especial à Dra Priscila Hiraiwa pela colaboração nas análises por citometria de fluxo. À Dra Dayane Rodrigues e à tecnologista Natalia Bueno pela colaboração nas cromatografias.

Aos meus colegas de laboratório por todo auxílio, troca de experiências, aprendizados, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao Instituto Carlos Chagas por toda a estrutura, em especial agradecimento às plataformas tecnológicas de Biologia Estrutural, Citometria de Fluxo e Microscopia.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular por propiciar mais essa etapa da minha formação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento

e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

Marie Curie

#### RESUMO

O coronavírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico da COVID-19, doença respiratória que se espalhou rapidamente pelo mundo a partir do final de 2019. Testes de detecção do genoma utilizando a técnica de RT-PCR são considerados os mais apropriados para detecção de infecções ativas, todavia esta técnica possui custo elevado, demanda laboratórios e profissionais especializados para sua implementação. Métodos de captura de antígenos têm auxiliado no rastreamento de infeccões ativas e vacinas e fármacos vêm sendo eficientes para conter a pandemia. No entanto, o número de casos e óbitos ainda é alto e o surgimento contínuo de novas variantes requerem a manutenção de medidas de contenção. Assim, a disponibilidade de testes de baixo custo e resultado rápido, que possam ser aplicados em massa e de forma contínua ainda são necessários. O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S de SARS-CoV-2 se mostrou um antígeno mínimo indutor de significativa resposta imune e, consequentemente, se tornou um alvo tanto para uso como antígeno em testes sorológicos como alvo de anticorpos em testes de captura de antígenos. Devido à similaridade entre o RBD de SARS-CoV-2 com RBD de SARS-CoV-1, ambos foram incluídos como parte deste estudo, cujo objetivo é estabelecer ferramentas para a produção de antígenos e anticorpos recombinantes em conformação nativa, em linhagens estáveis de células HEK293. A expressão dos RBDs foi obtida com êxito utilizando o vetor pIRES2-EGFP, sendo que a fluorescência emitida pela eGFP serviu para monitoramento da eficiência de transfecção e seleção das células com maior nível de expressão. Para produção de fragmentos de anticorpos do tipo Fab (fragment-binding domain), compostos por duas cadeias polipeptídicas, foram feitas otimizações no vetor pcDNAmod para inserir a sequência codificadora da eGFP, para servir como molécula indicadora, seguida de uma deca-histidina para facilitar a posterior purificação. Além disso, foi construído um novo vetor, denominado pDEHA, com sítios de restrição em locais apropriados para co-expressão de proteínas diméricas e contendo seguências de integração genômica por recombinação no locus AAVS1, considerado seguro para seleção de linhagens com expressão estável. Os vetores pcDNAmod-eGFP e pDEHA se mostraram eficientes para expressão do Fab do anticorpo CR3022. Nestes vetores as proteínas recombinantes são secretadas, sendo facilmente purificadas a partir do sobrenadante da cultura celular utilizando cromatografia de afinidade a níquel imobilizado. A expressão das cadeias pesada e leve do Fab CR3022 em diferentes clones transformados com o vetor pcDNAmod-eGFP, parece não ocorrer de forma esteguiométrica, confirmando as dificuldades inerentes à produção de proteínas hetero-oligoméricas. Análises do número de inserções no genoma e da taxa de transcrição utilizando PCR quantitativa não foram conclusivas, demandando mais análises para se compreender a origem da diferença de expressão das duas cadeias do Fab entre os clones. Os RBDs e o Fab CR3022 se mostraram eficientes em testes de interação in vitro. Os vetores de expressão e os procedimentos experimentais estabelecidos neste estudo podem contribuir para a produção de insumos para testes de diagnóstico da COVID-19, assim como podem servir para produção de outras proteínas diméricas em diferentes contextos e aplicações.

Palavras-chave: Expressão recombinante; HEK293; SARS-CoV-2; Proteínas diméricas; Linhagens celulares estáveis.

#### ABSTRACT

The SARS-CoV-2 coronavirus is the etiologic agent of COVID-19, a respiratory disease that in end of 2019 started to spread quickly around the world. SARS-CoV-2 viral genome detection using guantitative RT-PCR is considered the gold standard method for detecting active infections. However, this technique has a higher cost and requires specialized laboratories and professionals for its implementation. Antigen capture methods have contributed to track active infections while vaccines and drugs have been effective in containing the pandemic. However, the number of cases and deaths is still high, and the continuous emergence of new variants requires the maintenance of containment measures. Thus, low cost and fastresponse assays that can be applied in large scale and on a permanent basis are still needed. The receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 spike protein is a minimal antigen inducing a significant immune response and, consequently, has become a target both as an antigen in serological tests as well as for antibodies in antigen capture assays. Due to the similarity between the SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1 RBD, both were included as part of this study, whose objective is to establish tools for production of recombinant antigens and antibodies in native conformation in stable HEK293 cell lines. Expression of the RBDs was successfully achieved using the pIRES2-EGFP vector. The fluorescence emitted by eGFP was used to monitor transfection efficiency and select the cells with the highest expression level. For production of Fab antibody fragments (fragment-binding domain), composed of two polypeptide chains, optimizations were made in the pcDNAmod vector to insert the eGFP coding sequence, to serve as an indicator molecule, followed by a decahistidine to facilitate their subsequent purification. In addition, a new vector, named pDEHA, was constructed with restriction sites located at appropriate sites for cloning two coding sequences for co-expression of dimeric proteins, and with flanking sequences for genomic integration by recombination at the AAVS1 locus, which is considered safe for selecting cells lines with stable expression. The pcDNAmodeGFP and pDEHA vectors were efficient for Fab CR3022 expression. In these vectors, the recombinant proteins are secreted, being easily purified from the cell culture supernatant by affinity chromatography on immobilized nickel columns. Expression of the heavy and light chains in different clones of cells transfected with the pcDNAmod-eGFP vector seems not to occur stoichiometrically, confirming the difficulties inherent to the production of hetero-oligomeric proteins. Analyzes of the number of insertions in the genome and the transcription rate using quantitative PCR were not conclusive, requiring further studies to understand the origin of the difference in expression of the two Fab chains between the clones. The recombinant RBD from SARS-CoV-1 and SARS-Cov-2 and the CR3022 Fab proved to be efficient in vitro interaction assays. The expression vectors and experimental procedures established in this study can contribute to the generation of reagents for COVID-19 diagnostic tests, and for the production dimeric proteins in future studies.

Keywords: Recombinant expression; HEK293; SARS-CoV-2; Dimeric proteins; Stable cell lines.

# **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – E	ESTADOS CONFORMACIONAIS DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 2'	2
FIGURA 2 – E	ESTRUTURA DO RBD DE SARS-CoV-2 EM INTERAÇÃO COM ACE2	3
FIGURA 3 – A	LTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO RBM DE SARS-CoV-2 EM	
	POSIÇÕES CRÍTICAS PARA LIGAÇÃO COM ACE224	4
FIGURA 4 – I	NTERAÇÃO DO Fab CR3022 COM RBD DE SARS-CoV-1 E DE	6
		0
		2
	ESQUEIMA GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA	2
FIGURA / - 3		1
		ו ר
		2 -
FIGURA 9 – L	pIRES2-EGFP-RBD2	=
FIGURA 10 -	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS CULTURAS	
	TRANSFECTADAS COM pIRES2-EGFP-RBD1 E pIRES2-EGFP-	
	RBD2	8
FIGURA 11 –	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS POPULAÇÕES	
	CLONAIS DO RBD DE SARS-CoV-1 E DE SARS-CoV-2	9
FIGURA 12 –	ENRIQUECIMENTO DA 2ª TRANSFECÇÃO COM pIRES2-EGFP-	
	RBD2	1
FIGURA 13 –	ANÁLISE PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DOS CLONES	
	PROVENIENTES DA CULTURA ENRIQUECIDA DA 2ª	
	TRANSFECÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-2	1
FIGURA 14 –	INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA DE eGFP DAS POPULAÇÕES	;
	CLONAIS DO RBD DE SARS-CoV-2 DA 2ª TRANSFECÇÃO6	3
FIGURA 15 –	NÍVEL DE PRODUÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-2 E CORRELAÇÃO	
	COM eGFP	5
FIGURA 16 –	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO DO RBD DE SARS-CoV-1 E	
	SARS-CoV-2 ATRAVÉS DE ENRIQUECIMENTO POR CAPTURA EN	Λ
	RESINA DE NÍQUEL	6

FIGURA 17 – PURIFICAÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-1 EXPRESSO A PARTIR D	0
CLONE E5 E DO RBD DE SARS-CoV-2 A PARTIR DO CLONE C4	
6	38
FIGURA 18 – OBTENÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pcDNAmod-eGFP-	
CR3022HL	70
FIGURA 19 – EXPRESSÃO DO Fab CR3022 QUATRO DIAS APÓS	
TRANSFECÇÃO COM pcDNAmod-eGFP-CR3022HL	71
FIGURA 20 – ANÁLISE DA INTENSIDADE DE eGFP E DA EXPRESSÃO DO Fab	
CR3022 NOS CLONES GERADOS	73
FIGURA 21 – PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DO Fab	
CR3022 A PARTIR DOS CLONES E2 E G9	74
FIGURA 22 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DO Fab CR3022	
PREVIAMENTE PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA DE	
AFINIDADE DOS CLONES E2 E G9	75
FIGURA 23 – ANÁLISE DA PRESENÇA DA CL NAS FRAÇÕES ANTERIORES A	
ELUIÇÃO COM IMIDAZOL NA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	
DO Fab CR3022 DOS CLONES E2 E G9	76
FIGURA 24 – RNA TOTAL E DNA GENÔMICO EXTRAÍDOS PARA qPCR	77
FIGURA 25 – TESTE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES EM REAÇÃO	
DE qPCR	78
FIGURA 26 – TESTE DA CURVA PADRÃO PARA qPCR	79
FIGURA 27 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DAS CADEIAS PESADA E LEVE	31
FIGURA 28 – ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE qPCR PARA	
QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE mRNA	33
FIGURA 29 – EVENTOS DE INSERÇÃO GENÔMICA DAS CADEIAS PESADA E	
LEVE	35
FIGURA 30 – ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE qPCR PARA	
QUANTIFICAÇÃO DOS EVENTOS DE INSERÇÃO GENÔMICA	36
FIGURA 31 – ENSAIO DE DETECÇÃO DOS RBDs DE SARS-CoV-1 E SARS-CoV	′_
2 PELO Fab CR3022	39
FIGURA 32 – ANÁLISE DA INTERAÇÃO DIFERENCIAL DO Fab CR3022 COM	
RBD DE SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2	90
FIGURA 33 – VETOR DE EXPRESSÃO pDEHA_v1	92

IGURA 34 – CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO VETOR pDEHA_v1-CR3022HL
IGURA 35 – EXPRESSÃO DO Fab CR3022 NO QUARTO DIA APÓS
TRANSFECÇÃO COM pDEHA_v1-CR3022HL94
IGURA 36 – CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO NOVO VETOR pDEHA_v296
IGURA 37 – ANÁLISE DA ESTRUTURA DA AMINOGLICOSÍDEO 3'-
FOSFOTRANSFERASE MOSTRANDO A TROCA DE RESÍDUO
H188L97
IGURA 38 – CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO NOVO VETOR pDEHA_v3-
CR3022HL
IGURA 39 – ANÁLISE DA TRANSFECÇÃO COM pDEHA_v3-CR3022HL E DA
EXPRESSÃO DAS DUAS CADEIAS DO Fab CR3022100
IGURA 40 – ANÁLISE DA TRANSFECÇÃO COM pDEHA_v3-CR3022HL APÓS
SELEÇÃO COM G418 E DA EXPRESSÃO DAS DUAS CADEIAS DO
Fab CR3022101

# LISTA DE TABELAS

35 E
E
13
54
IA
79
30

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- ACE2 Enzima conversora de angiotensina 2
- cDNA DNA complementar
- CH Cadeia pesada
- CHO Ovário de hamster chinês
- CL Cadeia leve
- Cq Ciclo de quantificação
- gDNA DNA genômico
- eGFP Proteína verde fluorescente aprimorada
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- Fab Fragmento de ligação ao antígeno
- FDA Food and Drug Administration
- GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HEK293 Células embrionárias de rim humano
- IRES Sítio interno de entrada no ribossomo
- mRNA RNA mensageiro
- NeoR Gene codificante da enzima de resistência à neomicina
- ORF Fase aberta de leitura
- PBS Tampão fosfato salino
- qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa
- RBD Domínio de ligação ao receptor
- RBM Motivo de ligação ao receptor
- RT-PCR Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- SFB Soro fetal bovino
- TBE Tris Borato EDTA
- WPRE Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	.15
1.1 JUSTIFICATIVA	.16
1.2 OBJETIVOS	.17
1.2.1 Objetivo geral	.17
1.2.2 Objetivos específicos	.17
2 REVISÃO DE LITERATURA	.18
2.1 COVID-19	.18
2.1.1 Diagnóstico, tratamento e prevenção	.18
2.2 SARS-COV-2	.20
2.2.1 Interação com a célula hospedeira	.21
2.2.2 RBD e sua interação com ACE2	.23
2.3 ANTICORPO CR3022	.25
2.4 ANTICORPOS DO TIPO IMUNOGLOBULINA G	.27
2.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	.29
2.5.1 Vetores plasmideais para expressão em células de mamíferos	.30
3 MATERIAL E MÉTODOS	.32
3.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DNA	.32
3.1.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	.32
3.1.2 Extração de DNA plasmideal	.33
3.1.3 Reações de PCR	.34
3.1.4 Digestão de DNA	.35
3.1.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose	.35
3.1.6 Purificação de DNA a partir de gel de agarose	.36
3.1.7 Ligação de DNA	.36
3.1.8 Análise de DNA por sequenciamento	.37
3.2 OBTENÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS VETORES PLASMIDEAIS	.37
3.2.1 Obtenção das sequências codificadoras do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-	
CoV-2 e do Fab CR3022	.37
3.2.2 Subclonagem do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 no vetor pIRES2-	
EGFP	.38
3.2.3 Otimização do vetor pcDNAmod para expressão do Fab CR3022	.38
3.2.4 Construção do novo vetor pDEHA para expressão de proteínas diméricas	.39

3.2.4.1 Primeira versão do novo vetor	.39
3.2.4.2 Segunda versão do novo vetor	.41
3.2.4.3 Terceira versão do novo vetor	.43
3.3 CULTURA DE CÉLULAS HEK293	.44
3.3.1 Congelamento e descongelamento das células	.45
3.4 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE G418 PARA SELEÇÃO DE HEK293	
TRANSFECTANTES	.46
3.5 TRANSFECÇÃO	.46
3.5.1 Seleção da população transfectada	.47
3.6 PREPARO DE EXTRATO CELULAR	.48
3.7 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	.49
3.7.1 Purificação por gravidade	.49
3.7.2 Purificação em cromatógrafo	.49
3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE	.50
3.9 WESTERN BLOT	.51
3.10 ENSAIO ELISA INDIRETO	.52
3.11 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	.53
3.12 EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DO CDNA	.53
3.13 REAÇÕES DE PCR QUANTITATIVA	.54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	.56
4.1 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO RBD DE SARS-COV-1 E SARS-COV-2	.56
4.1.1 Subclonagem no vetor de expressão pIRES2-EGFP	.56
4.1.2 Transfecção de células HEK293, ensaios de expressão e seleção clonal	.57
4.1.3 Teste de enriquecimento da cultura transfectada com pIRES2-EGFP-RBD2 e	Э
análise da relação de expressão do RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP	.60
4.1.4 Purificação por cromatografia de afinidade a níquel imobilizado	.66
4.2 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO FAB CR3022	.69
4.2.1 Otimização do vetor pcDNAmod e montagem do vetor pcDNAmod-eGFP-	
CR3022HL	.69
4.2.2 Transfecção do pcDNAmod-eGFP-CR3022HL em células HEK293, ensaios	de
expressão e seleção clonal	.70
4.2.3 Análise da expressão do Fab CR3022 a partir dos clones E2 e G9	.73
4.2.4 Análises por PCR quantitativa	.76
4.2.4.1 Otimização das reações de qPCR	.77

4.2.4.2 Quantificação do nível de transcrição por qPCR	.80
4.2.4.3 Quantificação do número de inserções genômicas por qPCR	84
4.2.5 Análise da interação do Fab CR3022 com o RBD de SARS-CoV-1 e SARS-	
CoV-2	.87
4.3 CONSTRUÇÃO DE NOVO VETOR PDEHA PARA EXPRESSÃO DE	
PROTEÍNAS DIMÉRICAS	90
4.3.1 Novo vetor pDEHA_v1	90
4.3.2 Novo vetor pDEHA_v2	94
4.3.3 Novo vetor pDEHA_v3	98
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
REFERÊNCIAS	104

#### 1 INTRODUÇÃO

O vírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico da doença COVID-19, que teve o primeiro caso relatado em dezembro de 2019 na China e no início de 2020 passou a ser detectada em vários países, configurando uma pandemia. A sintomatologia da COVID-19 é variável, indo desde sintomas leves até a síndrome respiratória aguda grave, podendo levar à morte, embora também ocorram casos assintomáticos cujo número não foi definido pelo fato que as autoridades de saúde de forma geral recomendam testar apenas os casos sintomáticos e seus respectivos contactantes, mesmo sabendo-se que os infectados assintomáticos desempenham uma função importante na disseminação do vírus. A existência de casos assintomáticos se torna preocupante com relação a transmissão viral, devido ao não isolamento do infectado. Em 13 de outubro de 2022 haviam sido registrados no mundo 620.301.709 casos, com 6.540.487 óbitos (WHO, 2022a). No Brasil, até a mesma data foram registrados 34.739.865 casos, com 687.069 óbitos (BRASIL, 2022b).

Outros membros da família Coronaviridae, a qual pertence o vírus SARS-CoV-2, já causaram preocupantes surtos de pneumonia desde o início deste século, valendo mencionar SARS-CoV-1 em 2002-2004 e MERS-CoV em 2012 (Jiang et al., 2020). O processo de invasão dos coronavírus na célula hospedeira é mediado pela proteína estrutural da espícula (S). A proteína S de SARS-CoV-2 apresenta similaridade estrutural com a proteína S de SARS-CoV-1 e interage com o mesmo receptor celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), porém com maior afinidade, o que pode ter contribuído para a rápida transmissão do vírus (Wrapp et al., 2020). O método de detecção padrão para diagnóstico de infecção ativa de COVID-19 é a RT-PCR (reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) de amostras do trato respiratório, no entanto a técnica demanda laboratórios devidamente equipados e profissionais especializados para realização do teste. Outros métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos, captura de antígenos e ensaios sorológicos também têm auxiliado nas testagens. Vacinas contra SARS-CoV-2 foram introduzidas no final de 2020 e alguns fármacos têm sido autorizados para o tratamento da doença, proporcionando redução no número de hospitalizações e mortes. No entanto, até o momento a vacinação atingiu menos de 70% da população mundial (Ritchie et al., 2022), o número de casos de

infecção e óbitos continuam sendo registrados e as evidências epidemiológicas indicam que SARS-CoV-2 permanecerá em circulação por um bom tempo.

Desde o início da pandemia, novas variantes do SARS-CoV-2 têm surgido, sendo cinco delas relatadas como variantes de preocupação por serem mais transmissíveis ou virulentas do que a primeira cepa descrita. O surgimento de variantes virais também tem suscitado preocupação com relação à proteção pela imunidade gerada por vacinação (WHO, 2022b).

### **1.1 JUSTIFICATIVA**

O cenário da pandemia tem sofrido oscilações desde o seu início em 2019. Com a disponibilidade de vacinas e medicamentos o número de novas infeções e óbitos teve um decréscimo, no entanto com o surgimento de variantes virais foi verificado novas ondas de infecções, como consequência o número de infectados ainda é crescente e óbitos ainda são registrados. Embora as vacinas tenham sido implementadas no final de 2020, uma parcela significativa da população mundial ainda não foi vacinada, configurando outro agravante para a contenção da pandemia. Neste contexto, e frente à possibilidade deste vírus permanecer em circulação por muito tempo, verifica-se ainda a demanda de testes rápidos de diagnóstico da COVID-19, que possuam alta sensibilidade e especificidade, além de custo baixo e fácil aplicação para serem utilizados em massa e de forma contínua. O aumento da capacidade de diagnóstico tende a diminuir a transmissão do vírus, a partir da rápida identificação e isolamento dos infectados, e também a diminuir o impacto na economia, possibilitando o retorno imediato às atividades a todos os que forem diagnosticados como negativos. Justifica-se assim o estabelecimento de tecnologias direcionadas a produção de insumos, que possam ser utilizados em estudos de desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico da COVID-19, bem como auxiliar em outros estudos relacionados ao SARS-CoV-2.

O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S, por ser um indutor significativo de resposta imune, se tornou um alvo tanto para uso como antígeno em testes sorológicos como alvo de anticorpos em testes de captura de antígenos. Métodos de monitoramento sorológico, que auxiliam na avaliação da eficiência das vacinas, dependem de antígenos virais em conformação nativa e métodos de

captura de antígenos dependem da disponibilidade de anticorpos que reconheçam antígenos do SARS-CoV-2.

Neste contexto as moléculas escolhidas e utilizadas neste trabalho são o RBD de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2 e o Fab do anticorpo CR3022. O RBD de SARS-CoV-2 se apresenta como um antígeno imunodominante e apresenta a vantagem de ser uma molécula pequena quando comparada à proteína S completa. O CR3022 é um anticorpo contra SARS-CoV-1 que reconhece também o SARS-CoV-2 e interage com RBD em região de não competição com ACE2, e, além disso, o anticorpo não se encontra protegido por patente. O Fab (*fragment-binding domain*) é a porção dos anticorpos responsável pela ligação específica ao antígeno. Assim como o RBD, o Fab apresenta estrutura mais simples e baixa massa molecular, comparada com o anticorpo completo, favorecendo a sua produção em sistema heterólogo.

#### **1.2 OBJETIVOS**

#### 1.2.1 Objetivo geral

Estabelecer ferramentas para expressão recombinante de antígenos e anticorpos diméricos em conformação nativa, que possam auxiliar na produção de insumos em escala laboratorial para uso em estudos locais de desenvolvimento de testes de diagnóstico da infecção ativa causada por SARS-CoV-2.

#### 1.2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar o RBD da proteína S de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2 em células HEK293;
- Otimizar o vetor de co-expressão de proteínas diméricas pcDNAmod;
- Construir vetor com estrutura apropriada para clonagem de proteínas diméricas e geração de linhagens celulares com expressão estável;
- Expressar e purificar a porção Fab do anticorpo CR3022 em células HEK293;
- Testar a funcionalidade das proteínas recombinantes produzidas.

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 COVID-19

Os primeiros casos de COVID-19 oficialmente relatados na China foram associados à transmissão viral a partir de animais selvagens (Jiang; Du; et al., 2020) e, em pouco tempo, a transmissão passou a ocorrer de pessoa para pessoa (Chan et al., 2020; Jiang; Du; et al., 2020; Wang et al., 2020a). A principal via de transmissão entre os humanos ocorre a partir de gotículas respiratórias infectadas, podendo ocorrer também pelo contato com superfícies contaminadas (Shi et al., 2020 e Wu, D. et al., 2020)

A rápida disseminação geográfica do vírus pode ser relacionada à ocorrência de casos leves e assintomáticos e à transmissão eficiente de pessoa para pessoa, fatores que dificultaram a identificação dos infectados e, consequentemente, intensificaram a propagação do vírus (Guo et al., 2020; Li et al., 2020; Munster et al., 2020).

A COVID-19 pode se apresentar de formas diferentes em cada pessoa, podendo ser sintomática leve ou progredir para nível grave e levar o paciente a óbito. Na manifestação clínica leve a moderada, os sintomas mais comuns são febre, tosse, dores musculares e fadiga. Casos graves incluem como sintoma a dispneia e evoluem para a síndrome respiratória aguda grave. Casos críticos podem ter ainda outras complicações como lesões no coração, pulmão e rim, choque séptico e falência múltipla dos órgãos. Entre os doentes graves verifica-se predominância de indivíduos idosos e de pacientes com comorbidades como hipertensão, diabetes, doença pulmonar e doença cardíaca (Shi et al., 2020; Wu, D. et al., 2020). Casos assintomáticos, confirmados positivos em teste de detecção de ácidos nucleicos, também têm sido relatados na literatura (Zou et al., 2020). O período médio de incubação do vírus no organismo é de aproximadamente 5 dias, podendo variar entre 2 a 14 dias.

#### 2.1.1 Diagnóstico, tratamento e prevenção

O principal método utilizado para diagnóstico da COVID-19 é a detecção do ácido nucleico viral em amostras provenientes do trato respiratório de pessoas infectadas, por meio da técnica de RT-PCR (reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) (Shi et al., 2020 e Wu, D. et al., 2020). Fragmentos de genes virais codificantes das proteínas de envelope, da RNA polimerase dependente de RNA (Corman et al., 2020), da proteína espícula (Chan et al., 2020), do nucleocapsídeo e a fase aberta de leitura 1ab (ORF1ab) (Wang et al., 2020a), têm sido amplificados em pares, simultaneamente, para conferir maior sensibilidade ao teste. No entanto, apesar de ser o padrão-ouro para detecção de SARS-CoV-2, a técnica convencional de RT-PCR demanda maior tempo de processamento de amostras, equipamentos especializados e profissionais treinados. Como alternativa, foram desenvolvidas outras abordagens para detecção de ácidos nucleicos com menor tempo de resposta, como Amplificação Isotérmica Mediada por loop (Mardian et al., 2021).

Além dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, testes rápidos para detecção de antígenos e testes sorológicos têm sido desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da doença. Testes de captura de antígenos são aplicados no diagnóstico da infecção ativa, detectando a presença de proteínas virais. Em relação ao teste de RT-PCR, as plataformas de detecção de antígeno empregam tecnologias mais baratas, com processamento menos laborioso e dispositivos portáteis, propiciando maior abrangência das testagens. Os testes sorológicos de detecção de anticorpos são limitados quanto ao diagnóstico da infecção aguda, uma vez que a soroconversão normalmente ocorre durante a segunda semana após infecção, porém são importantes para diagnóstico de pacientes com manifestação sintomática tardia, identificando infecção prévia, e também são úteis para fins epidemiológicos e inclusive para eventual monitoramento da resposta imunológica gerada pela vacinação (Asselah et al., 2021; Mardian et al., 2021).

A pandemia levou a uma paralização das atividades mundiais de forma geral, gerando urgência no desenvolvimento de vacinas e medicamentos contra o vírus. Neste contexto, vacinas convencionais com vírus inativado, vacinas baseadas em vetor viral e vacinas de RNA mensageiro contra SARS-CoV-2 foram desenvolvidas em um curto prazo de tempo e a autorização para implementação ocorreu ainda no final de 2020. No entanto, até o momento (13 de outubro de 2022) menos de 70% da população mundial recebeu pelo menos uma dose da vacina, sendo que apenas cerca de 23% das pessoas em países de baixa renda foram vacinadas (Ritchie et al., 2022).

Em paralelo, dois fármacos foram aprovados pela agência regulatória dos EUA, a "FDA", para o tratamento de COVID-19. Um deles, o antiviral Veklury (remdesivir) é indicado para uso em pacientes adultos com risco de progressão para fase grave da doença e, o outro, o modulador imunológico Olumiant (baricitinibe) é recomendado para o tratamento de pacientes adultos hospitalizados que necessitam de suplementação de oxigênio. Outros produtos terapêuticos, como anticorpos monoclonais e imunomoduladores, também foram autorizados para uso emergencial (FDA, 2022). No Brasil, além desses dois fármacos aprovados pela FDA, Sotrovimabe, Evusheld®, Paxlovid e Molnupiravir também estão liberados para o tratamento da COVID-19, cada um com indicações e restrições específicas com relação às características do paciente e à gravidade da doença (BRASIL, 2022a).

Apesar dos testes de diagnóstico disponíveis e de todas as iniciativas de prevenção e tratamento, verifica-se ainda, conforme dados de 12 de outubro de 2022, o montante de 9 mil óbitos semanais a nível global (WHO, 2022c). No Brasil ainda são relatados mais de 20 mil novos casos e 227 óbitos por semana, dados de 13 de outubro de 2022 (BRASIL, 2022b).

#### 2.2 SARS-COV-2

SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com genoma de RNA simples fita de sentido positivo, pertencente à família Coronaviridae, gênero Betacoronavírus (Lu et al., 2020 e Zhou et al., 2020).

A família Coronaviridae compreende outros seis vírus capazes de infectar seres humanos, sendo que quatro desses (HCoV-NL63 e HCoV-229E do gênero Alfacoronavírus e HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 do gênero Betacoronavírus) são endêmicos, responsáveis por causar até 30% dos resfriados comuns. Os outros dois vírus, SARS-CoV-1 e MERS-CoV, pertencentes ao gênero Beta, causaram graves surtos de pneumonia (Ahn et al., 2020 e Tortorici; Veesler, 2019). SARS-CoV-1 foi responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) em 2002-2004, com pouco mais de 8 mil casos reportados e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10%, enquanto MERS-CoV causa a Síndrome Respiratória do Oriente Médio, doença notificada primeiramente em 2012, que acometeu cerca de 2500 pessoas e apresentou uma maior taxa de fatalidade, em torno de 35% (Jiang et al., 2020).

Assim como para outros coronavírus, morcegos são considerados o reservatório natural de SARS-CoV-2 (Zhou et al., 2020) e, provavelmente, algum mamífero comercializado em Wuhan, na China, tenha servido como hospedeiro intermediário para transmissão do vírus para humanos (Lu et al., 2020).

O genoma de SARS-CoV-2 apresenta cerca de 29,9 kb, codificando quatro proteínas estruturais, dezesseis não estruturais e nove fatores acessórios. A ORF1a e a ORF1b, que se apresentam na porção 5', são traduzidas em poliproteínas que são processadas formando as proteínas não estruturais, as quais estão envolvidas no mecanismo de replicação viral. A jusante estão localizados os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus: espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), intercalados pelas unidades transcricionais dos fatores acessórios (Wu, F. et al., 2020).

#### 2.2.1 Interação com a célula hospedeira

A proteína responsável pelo processo de invasão dos betacoronavírus na célula hospedeira é a glicoproteína estrutural S, que se projeta na superfície do vírus de forma homotrimérica. Cada monômero da proteína S é formado por duas subunidades funcionais ligadas não covalentemente. A subunidade 1 (S1) compreende o domínio de ligação ao receptor (RBD, *receptor-binding domain*), além de um domínio N-terminal (NTD, *N-terminal domain*), e a subunidade 2 (S2) apresenta os domínios responsáveis pela fusão do vírus à membrana celular. Após a interação do RBD com o receptor da célula alvo, proteases do hospedeiro realizam clivagens entre as subunidades S1/S2 e no início de S2 (S2') provocando alteração do estado de pré-fusão de S2, antes estabilizada por S1, para estado de pós-fusão. Essa alteração conformacional irreversível da proteína promove a fusão das membranas, permitindo a entrada do vírus na célula (Jiang et al., 2020 e Tortorici; Veesler, 2019).

A proteína S de SARS-CoV-2 apresenta elevada similaridade estrutural com a proteína S de SARS-CoV-1 (Walls et al., 2020 e Wrapp et al., 2020), compartilhando 76% de identidade da sequência de aminoácidos, sendo que S2 se apresenta mais conservada que S1, com 88% contra 75% de identidade (Walls et al., 2020).

A conformação da proteína S trimérica de SARS-CoV-2 depende da posição em que se encontra o RBD de cada monômero (Figura 1). Análises a partir de criomicroscopia eletrônica demonstraram estruturas totalmente "fechadas" ou parcialmente "abertas", com apenas um RBD no estado ascendente. No estado descendente o RBD se encontra voltado para o interior da estrutura, sendo necessária a sua exposição (estado ascendente) para interação com o receptor (Walls et al., 2020 e Wrapp et al., 2020).





FONTE: Adaptada de Walls et al. (2020). LEGENDA: À esquerda conformação "fechada" com os três RBDs na posição descendente e à direita conformação parcialmente "aberta" com um RBD na posição ascendente. Cada um dos três monômeros que compõe a proteína está representado com uma cor diferente.

A interação de SARS-CoV-2 com a célula hospedeira ocorre por meio da ligação do RBD com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (Walls et al., 2020 e Wrapp et al., 2020). O receptor ACE2 é uma proteína de membrana que atua no sistema de regulação da pressão arterial, mediando a maturação de angiotensina, sendo expressa em células do coração, rim (Donoghue et al., 2000), pulmão e intestino (Hamming et al., 2004). Após a interação com ACE2, a ativação de S2 ocorre de forma dependente de clivagens realizadas pela serina protease transmembrana do tipo II, TMPRSS2, e pela cisteína protease catepsina L (Hoffmann et al., 2020 e Ou et al., 2020). A presença de um sítio de reconhecimento de furina, próximo ao local de clivagem S1/S2, também sugere a participação dessa protease como potencial ativador de S2 (Coutard et al., 2020).

#### 2.2.2 RBD e sua interação com ACE2

O RBD de SARS-CoV-2 é um antígeno imunodominante e altamente específico para detectar anticorpos em pacientes da COVID-19 (Amanat et al., 2020; Premkumar et al., 2020). Anticorpos com elevado potencial de neutralização foram descritos para RBD de SARS-CoV-2 (Barnes et al., 2020; Pinto et al., 2020; Robbiani et al., 2020; Wu, Y. et al., 2020) e também para SARS-CoV-1 (Ter Meulen et al., 2006; Prabakaran et al., 2006 ; Walls et al., 2019).

O RBD apresenta nove resíduos de cisteínas (Figura 2), com oito deles formando quatro pontes dissulfeto que auxiliam na estabilização da estrutura (Lan et al., 2020). São relatados quatro sítios de glicosilação, N331, N343 (Yao et al., 2020), T323 e S325 (Shajahan et al., 2020).



FIGURA 2 – ESTRUTURA DO RBD DE SARS-CoV-2 EM INTERAÇÃO COM ACE2

FONTE: Adaptada de Lan et al. (2020). LEGENDA: Estrutura do RBD de SARS-CoV-2 (com RBM em vermelho e *core* proteico em ciano) em interação com ACE2 (em verde). Com *sticks* amarelos estão representadas as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteína (C480-C488, C379-C432, C336-C361 e C391-C525) indicados por setas.

A ligação do RBD de SARS-CoV-2 com ACE2 é mediada principalmente por interações polares (Wang et al., 2020b e Yang et al., 2020) e a interface de interação apresenta maior número de resíduos envolvidos e maior número de interações do que a interface de interação do RBD de SARS-CoV-1 com ACE2 (Shang et al., 2020 e Wang et al., 2020b), condizente com a diferença de afinidade de ligação dos complexos. O RBD de SARS-CoV-2 apresenta um motivo de ligação ao receptor (RBM, *receptor-binding motif*, Figura 2), localizado entre os resíduos Ser-428 e Gln-506, que contempla a maioria dos resíduos de interação com ACE2, exceto Lys-417. O RBM se apresenta em uma superfície externa côncava que acomoda a hélice  $\alpha$  N-terminal de ACE2 (Figura 2), sendo esta a estrutura que comporta grande parte dos resíduos da interface de interação (LAN et al., 2020).

São relatados de 17 (Lan et al., 2020) a 22 (Wang et al., 2020b) resíduos participantes da interface de interação, sendo que quatro posições críticas para ligação do RBM de SARS-CoV-1 em ACE2 apresentam alterações em SARS-CoV-2: Tyr-442 substituída por Leu-455 em SARS-CoV-2, Leu-472 por Phe-486, Asn-479 por Gln-493 e Thr-487 por Asn-501 (Figura 3). Essas alterações promovem a formação de um número maior de interações entre o RBM de SARS-CoV-2 e ACE2 (Lan et al., 2020 e Shang et al., 2020).

FIGURA 3 - ALTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO RBM DE SARS-CoV-2 EM POSIÇÕES CRÍTICAS PARA LIGAÇÃO COM ACE2



FONTE: Adaptada de Lan et al. (2020). LEGENDA: Substituição de Tyr-442 por Leu-455 (A), Leu-472 por Phe-486 (B), Asn-479 por Gln-493 (C) e de Thr-487 por Asn-501 (D) no RBD de SARS-CoV-2. RBD mostrado em ciano e ACE2 em verde.

O *loop* flexível, presente na porção distal do RBM de SARS-CoV-2, é estabilizado por uma ponte dissulfeto formada por Cys-380 e Cys-388 (Lan et al., 2020; Shang et al., 2020 e Wang et al., 2020b). Entre essas cisteínas ocorre a alteração do motivo Pro-Pro-Ala presente em SARS-CoV-1 pelo motivo Gly-Val-Glu-Gly (Shang et al., 2020 e Wang et al., 2020b). Essa alteração permite uma conformação diferencial do *loop* que favorece a formação de uma ligação de hidrogênio adicional (Shang et al., 2020). Outra alteração que favorece a ligação entre o RBD de SARS-CoV-2 e ACE2 é a substituição de Val-404 de SARS-CoV-1 por Lys-417. A Val-404 não interage com ACE2, enquanto Lys-417 promove a formação de uma ponte salina com o receptor (Lan et al., 2020).

As cinco novas cepas de SARS-CoV-2 consideradas variantes de preocupação (WHO, 2022b), por serem mais transmissíveis ou virulentas com relação à primeira cepa descrita, apresentam mutações em resíduos do RBD. As cepas alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351) e gama (P1) compartilham a mutação N501Y, que contribui para aumentar interação com receptor, aumentando infectividade e transmissibilidade, e a mutação E484K, que estaria envolvida com o escape de anticorpos, assim como a mutação K417N em beta e K417T em gama (Caniels et al., 2021). A cepa delta (B.1.617.2) apresenta as mutações L452R e T478K, associadas ao aumento da transmissibilidade, e E484Q (Thye et al., 2021). A cepa mais recente, a omicron (B.1.1.529) apresenta 15 mutações no RBD, entre elas K417N, T478K, Q498K e N501Y (CDC, 2022).

#### 2.3 ANTICORPO CR3022

Visto a similaridade estrutural e a identidade da sequência de aminoácidos da proteína S de SARS-CoV-2 com a proteína S de SARS-CoV-1 (Walls et al., 2020), anticorpos contra SARS-CoV-1 tem sido alvo de análises a fim de verificar a sua potencial reação cruzada contra SARS-CoV-2.

O Fab do CR3022, anticorpo isolado de paciente convalescente de SARS, tem sido utilizado com frequência para estudos de interação com o RBD (Wrobel et al., 2020; Yuan et al., 2020 e Wu, N. C. et al., 2020) em comparação à estrutura completa do anticorpo, IgG. O Fab (*fragment antigen-binding*) corresponde a porção do IgG que é responsável pela ligação ao antígeno.

O Fab do CR3022, interage com RBD de SARS-CoV-1 com constante de dissociação (K<sub>D</sub>) de 1 nM, em região que não se sobrepõe ao local de ligação com ACE2, ou seja, não compete com ACE2 (Figura 4). Com RBD de SARS-CoV-2 a interação ocorre com menor afinidade (K<sub>D</sub> de 115 nM) e sem impedimentos estéricos apenas na conformação duplo-aberta da proteína S, com dois RBDs na posição ascendente. Embora CR3022 seja neutralizante para SARS-CoV-1, não neutraliza SARS-CoV-2 (Yuan et al., 2020).

FIGURA 4 - INTERAÇÃO DO Fab CR3022 COM RBD DE SARS-CoV-1 E DE SARS-CoV-2



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Representação da interação do Fab CR3022 com RBD de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2 em região não competitiva com ACE2, construída no programa PyMOL a partir das estruturas 6M0J, 2GHV e 6W41 depositadas no banco de dados PDB, Protein Data Bank. CH: cadeia pesada do Fab CR3022; CL: cadeia leve do Fab R3022.

Na interação do CR3022 com o RBD de SARS-CoV-2 foi verificado a substancial participação da cadeia pesada do Fab em interação com os resíduos 368-370 e 374-386 (Wrobel et al., 2020). Dos 28 resíduos que formam epítopo para CR3022 no RBD de SARS-CoV-1, apenas 4 não são conservados para SARS-CoV-2 (A372, P384, T430 e H519). Destas 4 substituições no RBD, apenas P384 afeta a afinidade de ligação do CR3022. Em mutante SARS-CoV-2 com a reversão da prolina na posição 384 para alanina, correspondente em SARS-CoV-1, foi verificado aumento da afinidade, chegando a um K<sub>D</sub> igual a 1,4 nM. O anticorpo CR3022

também foi capaz de neutralizar este mutante SARS-CoV-2 P384A com um IC<sub>50</sub> de 3,2  $\mu$ g/mL e 4,4  $\mu$ g/mL, para IgG e Fab respectivamente, comparável com a atividade neutralizante em IC<sub>50</sub> de 5,2  $\mu$ g/mL do IgG para SARS-CoV-1 (Wu, N. C. et al., 2020).

O resíduo 384 em SARS-CoV-1 se apresenta 1,3 Å mais próximo da CDR H3 do CR3022, permitindo a formação adicional de uma segunda ponte de hidrogênio com o resíduo S96 da região variável da cadeia pesada (V<sub>H</sub>) do CR3022, além de uma interação intramolecular do S96 com o resíduo V<sub>H</sub> T31 (Wu, N. C. et al., 2020).

#### 2.4 ANTICORPOS DO TIPO IMUNOGLOBULINA G

Imunoglobulinas G (IgG) são anticorpos hetero-oligoméricos produzidos pelas células B do sistema imunológico em resposta a moléculas estranhas, denominadas antígenos. Cada IgG é composta por quatro subunidades, sendo duas cadeias leves (CL) e duas cadeias pesadas (CH), ligadas covalentemente por pontes dissulfeto, perfazendo estrutura semelhante a um "Y" (Figura 5A). Cada cadeia pesada possui três domínios constantes e um domínio variável, enquanto cada cadeia leve possui apenas um domínio constante e um domínio variável. Os domínios constantes 2 e 3 das cadeias pesadas compõem a base da estrutura em "Y", formando o fragmento cristalizável (Fc, *fragment crystalizable*) que é responsável por se ligar às células efetoras do sistema imunológico. Cada "braço" da estrutura em "Y", formado pela associação de uma cadeia leve completa com a porção restante de uma cadeia pesada, corresponde ao fragmento de ligação ao antígeno (Fab, *fragment antigen binding*) (Abbas et al., 2015).

O dobramento e a montagem apropriada são fatores cruciais para secreção do anticorpo funcional. Os domínios formadores das cadeias leve e pesada passam por processo de dobramento individual, com montagem inicial dos dímeros de cadeia pesada e em seguida as cadeias leves se associam covalentemente por meio de uma ligação dissulfeto. Diferente dos demais domínios, o domínio constante 1 da CH se dobra apenas depois do pareamento CH-CL, atuando como ponto de controle de qualidade para liberação do anticorpo. A CH fica retida no retículo endoplasmático (RE), pela ligação estável com a chaperona BiP, até a sua associação com CL. Caso esta associação não ocorra, CH permanece retida no RE

sendo posteriormente direcionada para degradação (Feige et al., 2010; Bhoskar et al., 2013).

O anticorpo funcional liberado pelo RE é capaz de reconhecer o antígeno específico por meio da porção Fab, mais especificamente por meio da extremidade N-terminal do Fab, onde encontram-se os domínios variáveis das cadeias leve e pesada. Cada domínio apresenta três regiões hipervariáveis, também denominadas de regiões determinantes de complementariedade (CDR), que contemplam a maioria dos resíduos que interagem com o antígeno, estabelecendo a especificidade da interação (Figura 5B). Estruturalmente os domínios são compostos por duas folhas  $\beta$ , cada uma com três a cinco fitas. As CRDs se encontram nas alças que conectam as fitas  $\beta$  (Abbas et al., 2015).



FIGURA 5 – ESTRUTURA IgG

FONTE: Adaptada de Abbas et al. (2015). LEGENDA: Em A estrutura de uma molécula de IgG secretada. Cadeias pesadas estão representadas em azul e vermelho, cadeias leves em verde. Em B esquema de um domínio variável, com folhas  $\beta$  representadas em vermelho e amarelo; na face que contém o N-terminal se encontram as alças das regiões determinantes de complementariedade (CDR); na face que contém o C-terminal se encontram as alças (em cinza) que ligam as fitas de uma folha  $\beta$  e a alça (em verde) que liga a fita de uma folha  $\beta$  na fita da outra folha  $\beta$ ; em azul está representada a ponte dissulfeto (S-S). N: extremidade amino terminal; C: extremidade carboxi terminal.

#### 2.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A expressão de proteínas recombinantes biologicamente ativas depende de adequada transcrição e tradução do gene heterólogo, bem como de modificações pós traducionais e adequado enovelamento da proteína (Liu et al., 2008).

O sistema de expressão bacteriano é o mais utilizado para obtenção de proteínas recombinantes, devido a sua simples manipulação, rápida multiplicação celular e ao elevado rendimento da proteína expressa. No entanto, este sistema apresenta certas limitações para expressão de proteínas eucarióticas, como insolubilidade das proteínas, formando agregados em corpos de inclusão, e enovelamento inapropriado, pela ausência de modificações pós-traducionais. Os sistemas eucarióticos, por sua vez, apresentam maquinaria necessária para realizar modificações pós-traducionais, como a glicosilação, possibilitando enovelamento correto de proteínas que requerem tais modificações. Porém o padrão de glicosilação varia entre as espécies (Gomes et al., 2016).

As linhagens celulares de mamíferos, além de apresentarem perfil de glicosilação semelhante às células de humano, são capazes de processar sinais e excretar as proteínas produzidas, gerando proteínas recombinantes adequadamente enoveladas e ativas do ponto de vista bioquímico (Ghaderi et al., 2012 e Gomes et al., 2016). Células CHO, provenientes de ovário de hamster chinês, e células HEK293, embrionárias de rim humano, representam duas linhagens celulares comumente utilizadas para produção industrial de proteínas recombinantes. Embora células CHO sejam muito bem caracterizadas e apresentem alta capacidade para expressão de proteínas heterólogas em linhagens estáveis, células HEK293 apresentam a vantagem de possuir perfil de glicosilação humano (Dumont et al., 2016).

A linhagem HEK293 foi imortalizada a partir da transformação com fragmentos de DNA de adenovírus tipo 5 (Ad5), tem origem epitelial e apresenta crescimento aderente. Devido a sua facilidade de transfecção, HEK293 tem sido utilizada para produção de proteínas recombinantes em pequena escala, enquanto linhagens derivadas adaptadas para crescimento em suspensão e meio de cultivo sem soro têm sido utilizadas na produção de proteínas terapêuticas em larga escala (Malm et al., 2020; Tan et al., 2021).

#### 2.5.1 Vetores plasmideais para expressão em células de mamíferos

Para obtenção de altos níveis de proteína recombinante em células de mamífero a partir de vetores plasmideais são utilizados promotores fortes, comumente provenientes de genomas virais como do Citomegalovírus (CMV) ou do vírus símio 40 (SV40), mas também promotores de genes humanos como o do fator de elongação 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Os promotores são geralmente acompanhados por *enhancers*, elementos que potencializam a atividade de transcrição do promotor. O término da transcrição é determinado por sinal de poliadenilação (poli-A), sendo o do hormônio de crescimento bovino (BGH) e do vírus SV40 os mais utilizados. Vetores que contêm origem de replicação viral permitem o aumento do número de cópias do plasmídeo e podem possibilitar um aumento no nível de expressão da proteína recombinante (Baldi et al., 2007; Hacker e Wurm, 2017).

Outros elementos regulatórios ainda podem ser utilizados para elevar a produção da proteína de interesse, como sítios de *splicing* e o elemento viral WPRE (*Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element*). A presença de pelo menos um íntron é verificada na maioria dos genes de eucariotos superiores e quando removido por *splicing* promove uma expressão gênica ótima (Nott et al., 2004). Em células de mamíferos a presença de íntron promove exportação rápida e eficiente do RNA mensageiro (mRNA) (Valencia et al., 2008), como também aumenta o seu nível de tradução (Nott et al., 2004). O WPRE têm sido relatado na literatura como um elemento adicional em vetores plasmideais para estabilização do mRNA, atuando no processamento da extremidade 3' UTR e também aumentando a exportação nuclear do mRNA(Backliwal et al., 2008; Callendret et al., 2007).

A co-expressão de cadeias polipeptídicas ou subunidades oligoméricas em células de mamíferos tem sido obtida de forma eficiente por meio de vetor único contendo mais de um cassete de expressão ou por intermédio de vetor único contendo elemento IRES (sítio interno de entrada no ribossomo). Hirashima et al. (2016) relataram alto nível expressam de fibrinogênio humano recombinante a partir de um único plasmídeo. O fibrinogênio é uma glicoproteína grande, com massa molecular de 340 kDa, composta por dois conjuntos de cada uma de suas três cadeias,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . No vetor construído, cada cadeia foi inserida em um cassete de expressão próprio, com promotor e sinal de poliadenilação. Além do nível elevado de expressão obtido, as propriedades funcionais do fibrinogênio recombinante se

mostraram semelhantes às do fibrinogênio humano (Hirashima et al., 2016). Além de permitir a expressão homogênea de todas as proteínas alvo, a construção de um único plasmídeo com vários cassetes de expressão possibilita também gerar linhagens celulares estáveis, expressando vários transgenes em uma única etapa (Kriz et al., 2010).

Vetores baseados em IRES possibilitam a co-expressão de cadeias polipeptídicas a partir de um único mRNA. Os elementos IRES são encontrados naturalmente em mRNA virais e celulares na porção 5' não traduzida (UTR) e permitem o recrutamento do ribossomo de forma independente de cap. Os genes que flanqueiam IRES são transcritos em um único mRNA, sendo que a ORF (fase de leitura aberta) a montante é traduzida pelo mecanismo dependente de cap 5', enquanto a tradução da ORF a jusante é mediada por IRES sendo independente de cap. Esta abordagem permite a construção de vetores multicistrônicos (Renaud-Gabardos et al., 2015). Vetores baseados em IRES têm sido utilizados para expressão de proteínas multiméricas e também para expressão de um gene repórter junto com o gene de interesse, como forma de verificação da eficiência de transfecção. Genes alvos ou que necessitam de um nível maior de expressão são inseridos a montante de IRES, visto que a produção da proteína a jusante tem tradução menos eficiente (Liu et al., 2008 e Renaud-Gabardos et al., 2015).

Os vetores plasmideais podem ser utilizados para transfecções transientes das células de mamíferos ou para o desenvolvimento de linhagens com expressão estável. Para expressão estável da proteína recombinante o DNA plasmideal pode ser direcionado para inserção em um local seguro do genoma, denominado porto seguro genômico, onde o transgene não sofrerá silenciamento gênico e também não afetará a expressão dos demais genes. Três loci gênicos do genoma humano têm sido alvo de estudos por garantirem expressão gênica sustentada, AAVS1, presente no cromossomo 19, CCR5 e ROSA26, presentes no cromossomo 3 (Sadelain et al., 2012 e Shin et al, 2020).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia utilizada no desenvolvimento do trabalho está esquematizada de forma geral abaixo (Figura 6), tendo início com as construções genéticas para transfecção das linhagens celulares até a análise de interação das proteínas recombinantes expressas.



FIGURA 6 – ESQUEMA GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA



## 3.1 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DNA

#### 3.1.1 Transformação de Escherichia coli

A propagação do DNA plasmideal foi realizada a partir da transformação de células cálcio-competentes da cepa DH5α de *Escherichia coli*. Foram utilizadas alíquotas de 50 μL de células competentes, previamente descongeladas em gelo. Para propagação dos plasmídeos comerciais foi adicionado 1 μL (100 ng/μL), para

transformação com reação de ligação com sistema pGEM-T Easy (Promega) foi adicionado 2 µL e para reação de ligação com demais vetores, todo volume da ligação, 10 µL. Após incubação em gelo por 30 minutos, foi dado choque térmico a 42 °C por 2 minutos e em seguida foi realizada incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, para transformação dos plasmídeos comerciais foi acrescentado 950 µL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e para transformação das reações de ligação foi adicionado 300 µL, seguido por incubação a 37 °C por 1h a 1h30 sob agitação de 200 rpm. Para transformação dos plasmídeos comerciais foram plaqueados 100 µL em LB sólido contendo antibiótico apropriado, conforme resistência apresentada pelo vetor, e para transformação das reações de ligação a cultura foi centrifugada a 14000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado, as células foram recuperadas em 100 µL de LB e plaqueadas em LB sólido contendo antibiótico.

As placas de cultivo utilizadas para transformação com sistema pGEM-T Easy, além do antibiótico ampicilina, continham IPTG (isopropil  $\beta$ -d-1tiogalactopiranosídeo) para indução da expressão e o substrato da enzima  $\beta$ galactosidase, o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo), para permitir a triagem de células transformadas, conforme orientações do fabricante.

#### 3.1.2 Extração de DNA plasmideal

O DNA plasmideal das colônias provenientes da transformação em *E. coli* com reações de ligação foi recuperado por lise alcalina, de acordo com o protocolo de mini preparação de Sambrook e Russell (2001), com modificações nas soluções 1 e 2. A solução 1 foi preparada com 50 mM Tris-HCl pH8 e 10 mM EDTA e a solução 2 com 0,15 M NaOH e 1% SDS.

Para recuperação dos plasmídeos comerciais e dos vetores utilizados para transfecção de células HEK293 foi realizado protocolo de Miraprep (Pronobis et al., 2016) com algumas modificações. Os tampões de ressuspensão (50 mM Tris-HCl pH8 e 10 mM EDTA, pH 8), lise (0,15 M NaCl e 1% SDS) e de neutralização (3 M de potássio e 5 M de acetato, pH 4,8) usados foram preparados manualmente. O DNA foi eluído em volume total de 280 µL, em 4 etapas sequenciais de 70 µL, utilizando a coluna e o tampão de eluição (pré-aquecido a 70 °C) do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Ao DNA eluído foi adicionado 10 µg/ml de RNAse A.

O DNA plasmideal extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e analisado por eletroforese em gel de agarose.

#### 3.1.3 Reações de PCR

As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) realizadas para amplificação das sequências de interesse foram feitas no termociclador ProFlex (Thermo Fisher Scientific), seguindo protocolo do fabricante da enzima utilizada. Para amplificação de fragmentos (TEV-eGFP, CR3022H, Cassete NeoR) a serem inseridos no vetor pGEM-T Easy, para posterior envio para sequenciamento, foi utilizada a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific), que adiciona 3'-A às extremidades do produto, viabilizando sua ligação nas extremidades 3'-T nos sítios de inserção do vetor. As demais reações de PCR foram feitas com a enzima *Platinum SuperFi DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Todas as reações foram feitas com 35 ciclos de amplificação e os produtos foram analisados em gel de agarose.

Abaixo, na tabela 1, estão indicados os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR convencionais, com as respectivas temperaturas de anelamento.
Fragmento	Oligonucleotídeos iniciadores	Enzima de restrição	Sequência	Ta °C	Molde
TEV-eGFP	EGFP-TEV-F	BamHI	TGGT <b>GGATCC</b> CTGGTTCCGCGTGGAT CTCATATGGAAAATCTGTACTTCCAAG GCGGTTCAATGGTGAGCAAGGGCGA GGAGCTGTT		pFLAG-EGFP (Simabuco et al., 2012)
	EGFP-Xho-R	Xhol	TGGT <b>CTCGAG</b> ACCACCCTTGTACAGC TCGTCCATGCCGAGAG	67	
AmpOri	Agel-Ori-F	Agel	GGT <b>ACCGGT</b> GGATAACGCAGGAAAGA ACATGTGAGC	07	pcDNA 3.1(+) (Thermo Fisher Scientific)
	Sall-M13-Amp-R	Sall	GGT <b>GTCGAC</b> ACGGAAACAGCTATGAC CATGGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA AATGT	- 67	
CR3022H	CH-EcoRI-F	EcoRI	CTT <b>GAATTC</b> AGGATGGGAATCCTGCC A	67	pcDNA3.1- CR3022H
	CR3022H-BgIII-R	Bg/II	GGT <b>AGATCT</b> GCCGCCACAGCTCTTGG GCTCCACCTTCTT	,	
Cassete NeoR	Xbal-NeoR-F	Xbal	GTG <b>TCTAGA</b> TAAT <u>GGT</u> TCTACTAGAGA ATGTG	- 56	pcDNAmod- eGFP (O autor, 2022)
	Sall-Agel-AfIII- NeoR-R	AflII	CCAGTCGACACAACCGGTGATA <b>CTTA</b> AGACCTAAGATACATTGATGAGTTTGG ACAAACC		

TABELA 1 - RELAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA PCRs

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Sítios para enzima de restrição destacados em negrito na sequência; códon alterado para destruição do sítio *Bg/*II no Cassete NeoR está sublinhado. Ta: temperatura de anelamento.

### 3.1.4 Digestão de DNA

As digestões de DNA foram realizadas com enzimas de restrição da New England BioLabs e Anza - Thermo Fisher Scientific, de acordo com as especificações de cada enzima. As digestões de DNA realizadas para viabilizar reação de ligação foram realizadas a partir de 10 µg de vetor e 5 µg dos plasmídeos contendo inserto de interesse. Para confirmação de clones positivos após transformação com as reações de ligação, as digestões foram realizadas com 1-3 µg de DNA plasmideal. As reações de digestão foram analisadas em gel de agarose.

### 3.1.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de PCR e as reações de digestão foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8-1%. Para aplicação, as amostras foram previamente homogeneizadas com tampão contendo 5% de glicerol, 0,04% de azul

de bromofenol e 0,04% de xileno cianol. Os géis foram preparados em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM), o mesmo utilizado para a eletroforese. A eletroforese foi realizada a 80-90 volts.

Como marcador de massa molecular foi utilizado 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen) e quando necessária a quantificação a partir da banda em gel foi utilizado o marcador *Precision Molecular Mass Ruler* (Bio-Rad).

Após corrida eletroforética, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (2 mg/mL) e analisados em sistema de transiluminação e fotodocumentação L-PIX (Loccus).

3.1.6 Purificação de DNA a partir de gel de agarose

Após a confirmação dos fragmentos de interesse, as bandas referentes ao produto de PCR, ao vetor linearizado e ao inserto liberado (provenientes das reações de digestão) foram purificadas a partir de gel de agarose. Para isso, o gel corado em brometo de etídeo foi colocado sobre transiluminador e as bandas correspondentes aos tamanhos dos fragmentos de interesse foram recortadas com auxílio de bisturi. As bandas foram transferidas para microtubo e a purificação do DNA foi realizada com uso do kit NucleoSpin (Macherey-Nagel), seguindo instruções do fabricante.

O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e analisado novamente em gel de agarose.

3.1.7 Ligação de DNA

A reação de ligação de DNA foi realizada com o vetor e o inserto de interesse, após purificação em gel de agarose, na relação molar de 1:3, a partir de 50 ng de vetor. A reação foi feita com 1  $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs) em volume total de 10  $\mu$ L. Após incubação por 1h a temperatura ambiente, toda reação foi usada para transformação de *E. coli* (seção 3.1.1).

Vetores que foram linearizados apenas com uma enzima de restrição, foram previamente submetidos a defosforilação com a enzima Fosfatase Alcalina (Thermo Fisher Scientific), conforme orientações do fabricante.

Para reação de ligação utilizando o sistema pGEM-T Easy (Promega), foi seguida as instruções do fabricante, porém para realização de metade da reação. Para transformação em *E. coli* (seção 3.1.1) foi utilizado 2 μL da reação.

### 3.1.8 Análise de DNA por sequenciamento

Os produtos de PCR inseridos em pGEM-T Easy e os insertos subclonados nos vetores de expressão foram sequenciados pelo método Sanger pela empresa GoGenetic. O sequenciamento foi analisado a partir do alinhamento da sequência obtida com a sequência pretendida e também a partir do eletroferograma gerado, utilizando o programa SnapGene.

### 3.2 OBTENÇÃO E CONSTRUÇÃO DOS VETORES PLASMIDEAIS

## 3.2.1 Obtenção das sequências codificadoras do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 e do Fab CR3022

As sequências codificadoras do RBD de SARS-CoV-1 (resíduos Asn318-Pro513, GenBank AAP33697.1), do RBD de SARS-CoV-2 (resíduos Val320-Leu533, NCBI YP\_009724390) e do Fab CR3022 (PDB 6W41) foram otimizadas e adquiridas da empresa GenScript no plasmídeo pcDNA3.1 (+) (Invitrogen).

Na porção N-terminal todas as sequências possuem o peptídeo sinal do vetor pOPING (Berrow et al., 2007) para secreção das proteínas recombinantes no sobrenadante da cultura celular. Na extremidade C-terminal os antígenos RBD de SARS-CoV-1 e RBD de SARS-CoV-2 e a cadeia pesada do Fab possuem a sequência codificadora para dez histidinas (10xHis), inserida para viabilizar o processo de detecção da proteína recombinante e de purificação por afinidade a níquel imobilizado. A cadeia leve do Fab, por sua vez, possui a etiqueta Myc para possibilitar sua detecção por Western blot.

## 3.2.2 Subclonagem do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 no vetor pIRES2-EGFP

As sequências codificadoras do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 foram isolados do plasmídeo pcDNA3.1 através de digestão com as enzimas de restrição *Nhel e Xhol e purificação de gel dos fragmentos de interesse para inserção entre os sítios das enzimas Nhel e Sall do vetor pIRES2-EGFP (Clontech) de modo que o gene codificante do antígeno ficou a montante de IRES. Esta ligação é possível graças a compatibilidade para ligação dos sítios de <i>Sall e Xhol. O vetor pIRES2-EGFP possui gene de resistência à neomicina como marcador de seleção para células transfectadas.* 

### 3.2.3 Otimização do vetor pcDNAmod para expressão do Fab CR3022

A otimização do vetor consistiu na inserção do gene eGFP, seguido por uma cauda 10xHis no plasmídeo pcDNAmod, que corresponde ao pcDNA3.1 modificado para possibilitar a subclonagem de dois cassetes de expressão (SANTOS, 2016).

Para tal, a sequência codificadora da cadeia pesada do Fab de outro anticorpo, o S230, foi inserida entre os sítios *Hin*dIII e *Not*I do plasmídeo pcDNAmod com gene de resistência à neomicina, para fornecer os sítios de restrição *Bam*HI e *Xho*I necessários para clonagem do gene eGFP, além de fornecer a cauda 10xHis. Em seguida o gene da eGFP foi amplificado por PCR utilizando a enzima *Platinum SuperFi DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) e clonado entre os sítios *Bam*HI e *Xho*I, que precedem o sítio *Not*I. Posteriormente a sequência nucleotídica da cadeia pesada do Fab CR3022 foi isolada do pcDNA3.1 através de digestão com as enzimas *Hin*dIII e *Bam*HI, purificada de gel e inserida entre os mesmos sítios do pcDNAmod para substituir a cadeia pesada do Fab do anticorpo S230, formando o vetor intermediário pcDNAmod-EGFP-CR3022H.

A sequência nucleotídica da cadeia leve do Fab CR3022 foi isolada do pcDNA3.1 através de digestão com as enzimas *Hin*dIII e *Not*I, purificada de gel e inserida entre os sítios *Hin*dIII e *Not*I a partir de outra cópia do plasmídeo pcDNAmod. Posteriormente o cassete de expressão da cadeia leve foi isolado deste plasmídeo por digestão com as enzimas *Bg*/II e *Spe*I, purificado de gel e inserido nos sítios de *Bg*/II e *Xba*I do vetor intermediário pcDNAmod-EGFP-CR3022H, ficando

localizado entre o cassete de expressão da cadeia pesada, que contém eGFP, e o cassete para o gene de resistência à neomicina. Esta ligação é possível em virtude da compatibilidade para ligação dos sítios de *Spe*I e *Xba*I.

# 3.2.4 Construção do novo vetor pDEHA para expressão de proteínas diméricas

### 3.2.4.1 Primeira versão do novo vetor

Para construção do novo vetor pDEHA para expressão de proteínas diméricas foi utilizado o plasmídeo phCMV3 (Genlantis) para obtenção das sequências nucleotídicas do promotor, do enhancer e do íntron A do CMV. O plasmídeo pcDNA3.1(+)neo (Invitrogen) foi usado para obter a sequência do sinal de poliadenilação (poli-A) do hormônio de crescimento bovino (BGH), do cassete para expressão do gene de resistência à neomicina e para obter as sequências do gene de resistência à ampicilina e da região de origem de replicação pUC para propagação em E. coli. Com base nessas sequências foram planejadas as alterações nucleotídicas para remoção e inserção de sítios de restrição apropriados para realização das subclonagens necessárias para construção do novo vetor. Também foram incluídos: o elemento regulatório WPRE (GenBank MQ259807.1), as regiões de homologia para recombinação no locus AAVS1 presente no cromossomo 19 (GenBank AC010327.8, HA-R nucleotídeos 8373-9204 e HA-L nucleotídeos 9208-10104), a sequência codificadora da proteína repórter LSSmKate2 (PDB 3NT3), o sítio de reconhecimento da protease TEV (tobacco etch vírus, ENLYFQG), a etiqueta de deca-histidina (10xHis) e a etiqueta Myc (EQKLISEEDL).

O cassete de expressão para a cadeia pesada (CasseteH - Figura 7A); o cassete para cadeia leve (CasseteL - Figura 7B); os fragmentos para recombinação homóloga no locus AAVS1 (CasseteHA-L-R - Figura 7C) e o cassete para o gene de resistência à neomicina (CasseteNeoR - Figura 7D) foram adquiridos comercialmente, na forma de fragmentos sintéticos de DNA, da empresa Biomatik clonados no plasmídeo pUC57. O gene de resistência à ampicilina e a região de origem de replicação em *E. coli* (fragmento AmpOri) foram amplificados por PCR, utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher

Scientific). A primeira versão do novo vetor pDEHA foi construída seguindo as seguintes etapas:

 Ligação dos fragmentos AmpOri com o CasseteHA-L-R, ambos previamente digeridos com as enzimas Sall e Agel gerando o vetor inicial pAmpOri-HA;

 Isolamento do CasseteNeoR do vetor pUC57-CasseteNeoR através de digestão com as enzimas Xbal e Af/II e inserção nos mesmos sítios do vetor inicial pAmpOri-HA, gerando o vetor intermediário pAmpOri-HA-Neo;

 Isolamento da sequência nucleotídica do elemento WPRE do pUC57-CasseteL através de digestão com a enzima *Bam*HI e ligação no plasmídeo no pUC57-CasseteH previamente digerido com a mesma enzima, gerando o plasmídeo pUC57-CasseteH-WPRE;

4. Isolamento da sequência nucleotídica do CMV-íntron presente no pUC57-CasseteH através de digestão com a enzima *Pst*I e inserção no mesmo sítio do plasmídeo pUC57-CasseteL, gerando o plasmídeo pUC57-CasseteL-CMV-íntron-WPRE;

5. Isolamento do CasseteL-CMV-íntron-WPRE do plasmídeo pUC57-CasseteL-CMV-íntron-WPRE através de digestão com as enzimas *Spel* e *Xbal* e inserção no sítio de *Xba*I do pUC57-CasseteH-WPRE (sítios de *Spel* e *Xba*I são compatíveis para ligação), gerando o plasmídeo pUC57-CasseteHeL;

 Isolamento do CasseteHeL do plasmídeo pUC57-CasseteHeL utilizando as enzimas Spel e Xbal e inserção no sítio de Xbal do vetor intermediário pAmpOri-HA-Neo, gerando o vetor final pDEHA versão 1 (pDEHA\_v1).

As cadeias pesada e leve do Fab CR3022 foram subclonadas subsequentemente, uma por vez, utilizando as enzimas *Eco*RI e *BgI*II e, *Hin*dIII e *Not*I, respectivamente.

#### FIGURA 7 - SEQUÊNCIAS DESENHADAS PARA CONSTRUÇÃO DO NOVO VETOR pDEHA



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Esquemas dos fragmentos de DNA sintéticos utilizados para construção do plasmídeo pDEHA. Cassete de expressão para a cadeia pesada (CasseteH) (A). Cassete de expressão para cadeia leve (CasseteL) (B). Regiões para recombinação homóloga no locus AAVS1 (HA-L e HA-R) (C). Cassete do gene de resistência à neomicina (CasseteNeoR) (D). São apresentadas todas as enzimas utilizadas nos passos de subclonagem. Os sítios de restrição utilizados nas clonagens estão indicados abaixo de cada esquema. Em negrito estão destacados os sítios para subclonagem da cadeia pesada em (A) e da cadeia leve em (B). Esquemas desenhados no programa SnapGene (GLS Biotech).

### 3.2.4.2 Segunda versão do novo vetor

A segunda versão do vetor foi construída para substituir a proteína fluorescente LSSmKate2, visando inserir uma proteína com fluorescência mais intensa expressa a partir de iniciação interna da tradução. Em paralelo foi necessária a remoção do elemento WPRE para reduzir o tamanho do mRNA final. Para esta construção, inicialmente o fragmento IRES2-eGFP foi amplificado por PCR de fusão (Figura 8) para remoção do sítio de restrição da enzima *Hin*dIII da IRES2. Para amplificação dos fragmentos intermediários 1 e 2 a serem fusionados foram utilizados iniciadores internos complementares (IRES2-Fusão2-F e IRES2-Fusão2-R, respectivamente), que contêm substituições nucleotídicas necessárias para destruir o sítio da enzima *Hin*dIII presente em IRES2 (C na posição 228 substituído G) e para preservar a estrutura secundária da molécula (G na posição 212 substituído por C). Os iniciadores externos adicionam uma cauda de dez histidinas mais um códon de terminação na porção 5' do fragmento 1 (IRES2-Fusão1-F) e o sítio para *Bam*HI na

porção 3' do fragmento 2 (BamHI-eGFP-R). As PCRs foram realizadas com a enzima *Platinum SuperFi DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Os produtos purificados foram utilizados em quantidade equimolar para fusão dos fragmentos intermediários.





FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Localização dos oligonucleotídeos iniciadores representada por setas.

Para PCR de fusão foi utilizado iniciador 3' BgIII-IRES2-F, para adição do sítio da enzima *BgII*I seguido pelo sítio de reconhecimento da protease TEV, e o iniciador 5' BamHI-eGFP-R, o mesmo utilizado para amplificar o fragmento 2. Nesta etapa foi utilizada a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) para viabilizar clonagem em pGEM-T Easy.

A construção da segunda versão do novo vetor seguiu as seguintes etapas:

 Isolamento do fragmento IRES2-eGFP do pGEM-T Easy utilizando as enzimas *Bg*/II e *Bam*HI e inserção nos mesmos sítios do pUC57-CasseteH de modo a substituir LSSmKate2 por IRES2-eGFP, gerando o plasmídeo pUC-57-CasseteH-IRES2-eGFP;

 Retirada do WPRE do pUC57-CasseteL-CMV-íntron-WPRE (resultante da etapa 4 da construção do pDEHA\_v1) através de digestão com *Bam*HI e religação sem a sequência nucleotídica do WPRE, gerando o pUC57-CasseteL-CMV-íntron;

 Isolamento do CasseteL-CMV-íntron do pUC57-CasseteL-CMV-íntron utilizando as enzimas Spel e Xbal e inserção no sítio de Xbal do pUC57-CasseteH-IRES2-eGFP, gerando o vetor pUC57-CasseteH-IRES2-eGFP-CasseteL;

4. Finalmente o CasseteH-IRES2-eGFP-CasseteL foi isolado do vetor pUC57-CasseteH-IRES2-eGFP-CasseteL utilizando as enzimas *Spel* e *Xba*l e inserido no sítio de *Xba*I do vetor intermediário pAmpOri-HA-Neo (resultante da etapa 2 da construção do pDEHA v1) gerando o vetor final pDEHA versão 2 (pDEHA v2).

As cadeias pesada e leve do Fab CR3022 foram subclonadas subsequentemente, uma por vez, utilizando as enzimas *Eco*RI e *BgI*II e, *Hin*dIII e *Not*I, respectivamente.

Fragmento	Oligonucleotídeos iniciadores	Enzima de restrição	Sequência	Ta °C	Molde
Intermediário 1	IRES2-Fusão1-F	-	GCGGCTCCCACCACCACCACCAT CACCACCACCACCACTAAGCCCC TCTCCCTCCCCCCCCCTA	68	pIRES2- EGFP
	IRES2-Fusão1-R	S2-Fusão1-R - CAAGAA <u>C</u> CTTCCAGAGGAACTG <u>G</u> TTCCTTC		_	(Clontech)
	IRES2-Fusão2-F	-	GAAGGAA <u>C</u> CAGTTCCTCTGGAAG <u>G</u> TTCTTG	_	pIRES2- EGFP (Clontech)
Intermediário 2	BamHI-eGFP-R	BamHI	TGG <b>GGATCC</b> TTACTTGTACAGCT CGTCCATGCCGAG	68	
IRES2-eGFP	BgIII-IRES2-F	BgIII	GGT <b>AGATCT</b> GAGAATCTGTACTT CCAGGGCGGCTCCCACCACCAC CACCATCA	68	Intermediários 1 e 2
	BamHI-eGFP-R	BamHI	TGG <b>GGATCC</b> TTACTTGTACAGCT CGTCCATGCCGAG		

TABELA 2 - RELAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA PCR DE FUSÃO

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Sítios para enzima de restrição estão destacados em negrito na sequência nucleotídica; nucleotídeos alterados para destruição do sítio *Hin*dIII estão sublinhados. Ta: temperatura de anelamento.

### 3.2.4.3 Terceira versão do novo vetor

Após insucesso das transfecções com os vetores pDEHA\_v1 e pDEHA\_v2, realizamos o alinhamento da sequência codificadora da enzima aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase presente no cassete de resistência à neomicina (cassete NeoR) com a sequência codificadora presente no pcDNAmod-eGFP. Tal análise revelou a presença de uma substituição de nucleotídeos e consequente troca de aminoácidos, que possivelmente inativou a enzima. A partir desta constatação foi construída uma terceira versão do vetor pDEHA, desta vez contendo a sequência codificadora original da enzima aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase. Para isso, o cassete NeoR contendo erro na sequência codificadora da enzima aminoglicosídeo 3'-

fosfotransferase presente no vetor pDEHA\_v2, foi substituído por outro cassete amplificado por PCR a partir do vetor pcDNAmod-eGFP. Para esta substituição, inicialmente o cassete NeoR foi amplificado por PCR utilizando como molde o vetor pcDNAmod-eGFP, os iniciadores Xbal-NeoR-F e Sall-Agel-AfIII-NeoR-R e, a *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) para viabilizar clonagem em pGEM-T Easy. O cassete NeoR amplificado por PCR foi digerido com as enzimas *AfI*II e *Xba*I e ligado no fragmento do pDEHA\_v2 contendo a origem de replicação e marca de resistência de *E. coli* e os cassetes de expressão das cadeias leve e pesada incluindo IRES2-eGFP, previamente digerido com as mesmas enzimas e isolado de gel, gerando a terceira versão do novo vetor (pDEHA\_v3). Após a subclonagem no pDEHA\_v3, o cassete NeoR amplificado por PCR se diferencia do pcDNAmod-eGFP por não possuir o sítio de *BgI*II e, do pDEHA\_v2 por não possuir o sítio de *Xho*I. Antes de prosseguir para transfecção de células, a sequência codificadora da enzima aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase foi verificada através de sequenciamento de DNA.

Para transfecção as três versões do novo vetor foram digeridas com as enzimas *Age*I e *Sal*I para linearizar o vetor, liberando a porção Amp-Ori e gerando o fragmento contendo os cassetes de expressão para a cadeia pesada, a cadeia leve e a enzima aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase flanqueado pelas regiões para recombinação homóloga HA-L e HA-R. Posteriormente o DNA dos vetores digeridos foi precipitado com três volumes de etanol absoluto (a -80 °C por 30 minutos, seguido por duas lavagens com 1 mL de etanol 70%), dissolvido em 5 mM Tris-HCI, pH 8.5, e quantificado em gel de agarose 0,8%.

## 3.3 CULTURA DE CÉLULAS HEK293

Células da linhagem HEK293, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (https://bcrj.org.br/bcrj.php), foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1x de GlutaMAX (Gibco) e 1x de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Passagens foram realizadas a cada 3-4 dias, quando as células atingiam confluência superior a 80%. As células foram lavadas com DPBS (Gibco) e desaderidas do recipiente de cultivo com tripsina-EDTA (Sigma) diluída para 1x em DPBS, por 5 minutos a 37 °C. A solução de tripsina foi inativada com 3

volumes de meio de cultivo suplementado e centrifugada por 5 minutos a 500 x g. Anterior a centrifugação uma alíquota foi reservada para contagem em câmara de Neubauer, utilizando corante azul de tripan para verificação de viabilidade celular. O sobrenadante celular foi descartado após a centrifugação e as células foram recuperadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1x de GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina de acordo com a densidade desejada.

Para o cultivo em placas de 6 poços (10 cm<sup>2</sup>) e em garrafas de 25 e 75 cm<sup>2</sup> foi seguida a proporção de 2,5 x  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>, sendo utilizado volume de meio de 2 mL, 5 mL e 15 mL, respectivamente. Para garrafas de 300 cm<sup>2</sup> foram utilizadas 3,3 x  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> e 50 mL de meio.

As culturas transfectadas foram submetidas ao mesmo procedimento de cultivo, porém em meio seletivo: Opti-MEM (Gibco) suplementado com 2,5% de SFB, 1x de GlutaMAX, 1x de Penicilina/Estreptomicina contendo 600 µg/mL de G418 (Sigma).

### 3.3.1 Congelamento e descongelamento das células

Para congelamento, as células provenientes de culturas de 3-4 dias foram desaderidas com tripsina, centrifugadas e recuperadas em solução contendo 95% de SFB (Gibco) e 5% de DMSO (Sigma), na concentração de 1-2 x 10<sup>6</sup> células/mL. Os tubos criogênicos com 1 mL da solução de células foram transferidos para CoolCell (Corning) e acondicionados a -80°C, de 4h a 24h, até o seu armazenamento em nitrogênio líquido.

Para descongelamento, o criotubo foi colocado em estufa a 37°C, por cerca de 10 minutos ou até que praticamente todo o conteúdo estivesse descongelado. A solução com células foi adicionada em tubo de fundo cônico contendo 4 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1x de GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina e centrifugada a 500 x g por 5 minutos. As células foram recuperadas em 2 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1x de GlutaMAX e 1x de 1x de Penicilina/Estreptomicina, adicionadas em garrafa de 75 cm<sup>2</sup> contendo 8 mL deste meio suplementado e acondicionadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte o meio foi substituído por 15 mL de meio novo e a cultura foi acompanhada por 3 dias até a realização da primeira passagem após o descongelamento.

# 3.4 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE G418 PARA SELEÇÃO DE HEK293 TRANSFECTANTES

O teste da concentração necessária do antibiótico G418 para matar as células HEK293 que não apresentam resistência à neomicina, foi realizado com 5 x 10<sup>4</sup> células, em placa de 24 poços contendo 400 µL de meio. Foram testadas as seguintes concentrações 0, 200, 400, 600 e 800 µg/mL de G418 (Sigma), a partir da solução comercial de 50 mg/mL. A viabilidade celular foi acompanhada em microscópio óptico e a partir de contagem celular com azul de tripan a cada três dias.

### 3.5 TRANSFECÇÃO

As células foram ambientadas previamente com duas passagens em Opti-MEM suplementado com 2,5% de SFB, 1x de GlutaMAX, 1x de Penicilina/Estreptomicina. A transfecção foi realizada com Lipofectamina (Invitrogen) seguindo o procedimento do fabricante e as orientações dispostas por Hawley-Nelson et al. (2008).

No dia anterior à transfecção, cerca de 24h, foram semeadas 2,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> em Opti-MEM suplementado com 2,5% de SFB, 1x de GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina. No dia da transfecção, para cada 2,5 x 10<sup>4</sup> células, foram diluídos separadamente 250 ng do DNA plasmideal e 1,5 µL de Lipofectamina em 12,5 µL de Opti-MEM não suplementado. Para transfecção em placa de 6 poços foi utilizado: 2,5 x 10<sup>5</sup> células, 2,5 µg de DNA, 15 µL de Lifofectamina e o volume total de 250 µL Opti-MEM (sendo metade para diluição do DNA e metade para Lifofectamina); em garrafa de 25 cm<sup>2</sup>: 6,25 x 10<sup>5</sup> células, 6,25 µg DNA, 37,5 µL de Lifofectamina e o volume total de 625 µL de Opti-MEM; em garrafa de 75 cm<sup>2</sup>: 1,88 x 10<sup>6</sup> células, 18,75 µg de DNA, 112,5 µL de Lifofectamina e o volume total de 1,88 mL de Opti-MEM. O DNA diluído foi adicionado sobre a Lipofectamina diluída, homogeneizado por pipetagem e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultivo das células foi substituído por Opti-MEM suplementado apenas com 1x de GlutaMAX (735 µL para placa de 6 poços, 1,84 mL para garrafa de 25 cm<sup>2</sup> e 5,5 mL para garrafa de 75 cm<sup>2</sup>), considerando metade do volume final de cultivo e descontando o volume do complexo a ser adicionado. O complexo DNA-

Lipofectamina foi adicionado sobre as células, gotejando por toda superfície, seguido de homogeneização cuidadosa. As culturas foram incubadas por 5h à 37 °C em estufa, com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente foi adicionado Opti-MEM suplementado com 1x de GlutaMAX e 5% de SFB (1 mL para placa de 6 poços, 2,5 mL para garrafa de 25 cm<sup>2</sup> e 7,5 mL para garrafa de 75 cm<sup>2</sup>), para atingir o volume final de cultivo (2 mL, 5 mL e 15 mL, respectivamente) com SFB na concentração de 2,5%. A cultura controle foi submetida ao mesmo procedimento, porém na ausência de DNA.

### 3.5.1 Seleção da população transfectada

No quarto dia após a transfecção, as culturas controle e transfectada foram submetidas à seleção com 600 µg/mL de G418, visando selecionar as células que incorporaram o cassete de resistência à neomicina presente nos vetores de expressão utilizados. Antes da adição de G418, parte da cultura passou por enriquecimento da população com fluorescência mais intensa da eGFP utilizando citometria de fluxo.

Para análise no citômetro de fluxo as células foram diluídas na concentração de 1 x  $10^6$ /mL em DPBS, contendo 20% de Opti-MEM e 2% SFB. O enriquecimento foi realizado no FACSAria II (BD) configurado no modo rendimento para recuperação de 10% das células com fluorescência mais intensa, sob refrigeração a 4 °C, utilizando bico ejetor de 100 µm, pressão de 20 psi, laser de excitação a 488 nm e filtro 530/30. As células foram coletadas em DPBS, contendo 20% de Opti-MEM e 2% SFB e centrifugadas por 5 minutos a 500 x g. Para recuperação e seleção, as células foram semeadas em 50% de meio DMEM com 10% SFB, 1x GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina + 50% de meio condicionado, acrescentado de 600 µg/mL de G418.

O meio condicionado foi obtido a partir do cultivo de células HEK293 por 3-4 dias em DMEM com 10% SFB, 1x GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina. O meio coletado foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril e armazenado a 4 °C até o momento do uso, respeitando intervalo máximo de uma semana.

A cultura controle da transfecção foi semeada nas mesmas condições da cultura transfectada, enriquecida e não enriquecida, para acompanhamento da

seleção por antibiótico. A cada 2-3 dias foi realizada a troca do meio das culturas, fazendo lavagem cuidadosa com DPBS para retirar as células mortas. Após período de seleção e reestabelecimento da cultura transfectada, o meio foi substituído por Opti-MEM seletivo.

Para seleção de clones, as culturas selecionadas com G418, enriquecida pela intensidade de fluorescência (E) e apenas selecionada pelo antibiótico (SA), foram preparadas para separação de célula única em FACSAria II, conforme descrito acima. Foi definido coletar os clones a partir do grupo de células que representava 10% da população com fluorescência mais intensa. A coleta de uma célula por poço foi realizada em placa de 96 poços contendo 200 µL de 50% de DMEM, 20 mM Hepes, 10% SFB, 1x GlutaMAX e 1x de Penicilina/Estreptomicina + 50% de meio condicionado + 600 µg/mL de G418. As placas foram incubadas à 37 °C em estufa, com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, e duas semanas após o procedimento, o meio foi substituído por 200 µL de Opti-MEM seletivo. A partir da terceira semana, quando já havia quantidade considerável de células na placa de 96 poços, as células foram passadas para placas de 24 poços contendo 400 uL de Opti-MEM seletivo e a expansão subsequente da cultura foi realizada gradualmente em placa de 6 poços e nas garrafas de cultivo.

O citômetro CytoFLEX LX (Backman Coulter) foi utilizado para análise de fluorescência da cultura transfectada com vetor pDEHA. Para isso, 5 x  $10^5$  células foram preparadas em 500 µL de DPBS, contendo 20% de Opti-MEM e 2% SFB. Ao volume de 190 µL foi adicionado 10 µL de iodeto de propídeo (100 µg/mL) para avaliação da viabilidade celular, utilizando laser de excitação em 561 nm e canal Y585-PE. O volume restante foi utilizado para detecção da fluorescência com laser de excitação a 488 nm no canal B525-FITC.

As linhagens estabelecidas (populações e clones) foram congeladas a -80 °C e armazenadas em nitrogênio líquido.

### 3.6 PREPARO DE EXTRATO CELULAR

As células foram lavadas três vezes em PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>), com centrifugação a 1000 x g por 5 minutos, a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspenso em PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1 mM do inibidor de protease PMSF, na proporção de 500  $\mu$ L para cada 10<sup>7</sup>

células. A lise celular foi realizada por sonicação em gelo, com amplitude igual a 5 em dois ciclos de 15 segundos e intervalo de 2 minutos em gelo, no sonicador Q700 (Qsonica) utilizando ponteira de 3 mm. O lisado foi centrifugado a 10000 x g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para análise em SDS-PAGE e Western blot.

## 3.7 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

## 3.7.1 Purificação por gravidade

A purificação das proteínas recombinantes expressas em pequena escala, obtidas do sobrenadante de culturas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, foi realizada por gravidade com resina de níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow – GE Healthcare) em coluna de 1 mL. Para purificação dos RBDs foram utilizados 100 uL de resina e para o Fab CR3022 50 uL de resina.

O sobrenadante de culturas de 3-4 dias, equivalente a 10 mL, foi coletado e centrifugado à 4000 x g por 10 minutos, seguido por incubação com a resina por 1h à 4 °C, em agitador orbital. Após passagem pela coluna, a etapa de lavagem foi realizada com tampão composto por 50 mM de Tris-HCl, 300 mM de cloreto de sódio e 20 mM de imidazol (pH8,0) para o RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 e composto por 20 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio e 20 mM imidazol (pH 7,5) para o Fab CR3022. A eluição foi realizada com 4 volumes de resina utilizando tampão similar, porém contendo 800 mM de imidazol para os RBDs e 500 mM de imidazol para o Fab CR3022. A resina remanescente foi ressuspensa em 1 volume de tampão de lavagem e coletada para análise junto com as demais frações.

### 3.7.2 Purificação em cromatógrafo

Para purificação de expressão em maior escala,  $9,9 \times 10^6$  células expressando a proteína de interesse foram cultivadas em garrafa de 300 cm<sup>2</sup>, contendo 50 mL de meio Opti-MEM suplementado. Com 3-4 dias de cultivo, com confluência celular superior a 90%, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4000 x g por 20 minutos, filtrado em membrana com poro de 0,22 µm e, quando não purificado imediatamente, congelado a -80 °C. Sobrenadantes congelados foram

descongelados durante a noite a 4 °C e centrifugados a 20000 x g por 10 minutos antes da purificação.

A cromatografia de afinidade foi realizada em cromatógrafo ÅKTA Pure (GE Healthcare) com a coluna HisTrap Fast Flow Crude de 5 mL (Cytiva), com fluxo de passagem fixado em 2 mL de amostra por minuto. A etapa de lavagem foi feita com 14 volumes de coluna utilizando tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 200 mM cloreto de sódio, 20 mM imidazol (pH 8,0) para o RBD de SARS-CoV-1; 20 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio e 20 mM imidazol (pH 7,5) para o RBD de SARS-CoV-2; e 20 mM Tris-HCl, 300 mM cloreto de sódio e 20 mM imidazol (pH 8,0) para o Fab CR3022. A eluição foi realizada em dois gradientes de imidazol, sendo o primeiro com 10 volumes de coluna de 20 a 50 mM de imidazol seguido por gradiente de 50 a 500 mM de imidazol em 10 volumes. Para eluição foi utilizado o tampão de lavagem corresponde a cada proteína descrito acima, completado para 500 mM de imidazol.

As frações eluídas dos RBDs foram congeladas com 10% de glicerol a -80 °C. As frações do Fab CR3022 foram armazenadas em gelo na câmara fria por 16-18h, quando passaram por concentração em Amicon de corte de 3 kDa (Merck), sendo centrifugado a 4000 x g, 4 °C, até atingir volume aproximado de 550 µl. Em seguida a amostra concentrada foi centrifugada por 10 minutos a 10000 x g, 4° C, e submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 (Cytiva), com fluxo de 0,75 mL/minuto utilizando tampão contendo 20 mM Tris-HCl e 150 mM NaCl (pH 8,0). As frações obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) com leitura da absorbância em 280 nm, considerando a massa molecular do Fab CR3022 recombinante (82,2 kDa) e o coeficiente de extinção oxidado (109390), obtidos por intermédio da ferramenta ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/). Frações superiores a 40 µg/mL foram concentradas em Amicon de corte de 3 kDa (Merck), para congelamento a -80 °C.

### 3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE

Poliacrilamida 13% foi utilizado para análise das amostras proteicas em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS). As amostras foram preparadas com tampão contendo 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS,

5% de β-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol e fervidas a 95 °C por 5 minutos. O gel de empilhamento das amostras foi preparado com 350 µL de solução de poliacrilamida 33% misturado com 300 µL de Tris-HCl 1 M (pH6,8), 25 µL de solução SDS 10%, 17,5 µL de persulfato de amônio 10%, 3,5 µL de TEMED e com quantidade suficiente de água para 2,5 mL. O gel de separação das amostras a 13% foi preparado com 1,9 mL de solução de poliacrilamida 33% misturado com 800 µL de Tris-HCl 2,5 M (pH8,8), 50 µL de solução SDS 10%, 35 µL de persulfato de amônio 10% e 3,5 µL de TEMED e com quantidade suficiente de água para 5 mL. A eletroforese foi realizada a 120 volts em tampão Tris-Glicina (25 mM-192 mM) contendo 0,1% de SDS. Após a eletroforese foi utilizada solução de Azul de Coomassie (0,1% de Azul de Coomassie R-250, 45% de metanol, 10% de ácido acético) para coloração dos géis e a descoloração foi feita com solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

### 3.9 WESTERN BLOT

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida a transferência das proteínas para membrana foi realizada em sistema submerso utilizando *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), a 4 °C por 2h a 60 volts ou durante a noite a 20 volts. Foi utilizada membrana de PVDF 0,45 µm (GE Healthcare), previamente ativada em metanol por 5 minutos, e tampão Tris-Glicina (25 mM-192 mM) contendo 20% de metanol.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite em PBS-Tween (PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 1h em temperatura ambiente sob agitação baixa ou mantido previamente a 4 °C por 16-18h. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário diluído em PBS-Tween por 1h30 sob agitação baixa. A incubação com anticorpo secundário, diluído em PBS-Tween, foi realizada por 50 minutos sob agitação baixa. Entre as incubações foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween e após a retirada do anticorpo secundário, duas lavagens com PBS-Tween e uma com PBS.

Para os anticorpos primários Anti-Histidina 1:3000 (Sigma, H1029), Anti-GAPDH 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, sc32233) e Anti-cMyc 1:250 (Invitrogen, 9E10) foi utilizado o anticorpo secundário Anti-Mouse Alexa 680 1:10000 (Thermo Fisher Scientific, A-21058); para o anticorpo primário Anti-GFP 1:3000 (Abcam,

Ab290) foi utilizado o anticorpo secundário Anti-Rabbit IRDye800 1:1000 (LI-COR, 926-32210).

A detecção dos sinais fluorescentes, emitidos após excitação do fluoróforo conjugado aos anticorpos secundários, foi realizada em equipamento Odyssey (LI-COR).

### 3.10 ENSAIO ELISA INDIRETO

Para ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indireto as frações do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, congeladas após purificação por cromatografia de afinidade, foram submetidas a diálise contra solução contendo 20 mM tampão fosfato de sódio e 100 mM NaCl, pH7,4, em membrana Spectra/Por1 de corte de 6-8 kDa, para retirada do imidazol. Posteriormente as amostras foram concentradas em Amicon de corte de 3 kDa (Merck), quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) com leitura da absorbância em 280 nm, considerando a massa molecular do RBD de SARS-CoV-1 (25,3 kDa) e do RBD de SARS-CoV-2 (27,2 kDa) e o coeficiente de extinção oxidado (42330 e 35340, respectivamente), obtidos por intermédio da ferramenta ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/), e depois as amostras foram congeladas em -80° C.

No momento do uso, os RBDs e os clones E2 e G9 do Fab CR3022 foram descongelados em gelo, centrifugados a 20000 x g por 10min e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

O ELISA foi realizado com imobilização de 100  $\mu$ L do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 (nas quantidades de 850, 800, 400, 200, 100 e 50 ng) em placa de 96 poços (CellStar, Greiner), incubada por 16-18h à 4° C, seguido por bloqueio (200  $\mu$ l) com 5% de leite em PBS-Tween por 1h. A incubação com 100  $\mu$ l do Fab CR3022 (nas quantidades de 2000, 1000, 500, 400, 200, 100 e 50 ng) foi realizada por 1h, assim como a posterior incubação com anticorpo primário Anti-GFP Mouse (Roche) diluído 1:1000 em PBS-Tween e com anticorpo secundário Anti-Mouse Peroxidase (Sigma) diluído 1:20000. A solução de substrato cromogênico TMB (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada e após 4 minutos e 30 segundos a reação enzimática foi parada com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A absorbância em 450 nm foi medida em leitor de placas (Kasuaki).

Entre as incubações foram efetuadas três lavagens com 190 µl de PBS-Tween, sendo realizada uma e duas lavagens adicionais após a remoção do anticorpo primário e do secundário, respectivamente. Antes da etapa de adição do Fab CR3022 e, também, do substrato enzimático foram efetuadas ainda três lavagens com PBS.

## 3.11 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração de DNA das células HEK293 foi realizada com reagente TRizol (Invitrogen) e com kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN). Células cultivadas por 3-4 dias foram recuperadas por tripsinização e centrifugadas por 5 minutos a 500 x g. O sobrenadante foi descartado e em seguida as células congeladas a -80 para posterior extração do DNA com kit ou foram previamente homogeneizadas em 750 µl de TRizol.

Para extração com TRizol foram utilizadas 5 x 10<sup>6</sup> células e o DNA extraído foi ressuspenso em 300 µl de NaOH 8 mM. Para o kit foram utilizadas 2 x 10<sup>6</sup> células e o DNA foi ressuspenso em 100 µl do tampão de eluição. Ambas as extrações foram realizadas seguindo o protocolo dos fabricantes.

O DNA genômico (gDNA) obtido foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TBE.

## 3.12 EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DO CDNA

A extração do RNA foi realizada com kit RNeasy Mini (Qiagen) a partir de 5 x 10<sup>6</sup> células, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a -80° C.

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose usando tampão MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM). Alíquotas com 2 µg de RNA foram homogeneizadas com três volumes de tampão de amostra (60% de formamida, formaldeído 2,5 M, tampão MOPS 20 mM e 10% de solução corante), adicionado de 1 µg de brometo de etídeo, e posteriormente incubadas a 65 °C por 5 minutos. Previamente, a solução corante foi preparada com 0,25% de azul de bromofenol, 25% de glicerol e 20 mM de tampão MOPS e o gel

preparado com 1% de agarose, tampão MOPS 1 mM e formaldeído 2,1 M. Foram utilizados reagentes e água livres de RNase. Os aparatos da eletroforese foram tratados com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos ou com ElectroZap (Thermo Fisher Scientific) e enxaguados com água livre de RNase.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) a partir de 2 µg de RNA, seguindo o protocolo do fabricante. Para reação foi utilizado iniciador Oligo d(T) (Thermo Fisher Scientific). À reação final foi adicionado 180 µl de água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

### 3.13 REAÇÕES DE PCR QUANTITATIVA

As reações foram realizadas no sistema de PCR em tempo real LightCycler 96 (Roche), a partir de 2 µl de cDNA e diferentes concentrações de gDNA, em placa de 96 poços. Cada reação foi realizada em volume final de 20 µl, 10 µM de iniciadores e contendo mix de reação 1x.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando o programa online Primer3Plus (https://www.primer3plus.com/index.html), com os parâmetros padrão do programa para qPCR (Tabela 3).

Identificação	Iniciador-F	Iniciador-R
CR3022_H-1	AGAGCATCAACACAGCCTACC	TCCATTGGTGTGCTGATTCC
CR3022 H-2	ACACATTTCCTGCCGTGCTG	TGGCTTGTGATTCACGTTGC
CR3022_H-3	ATCATCTACCCCGGCGATTC	AGGCTGTGTTGATGCTCTTG
CR3022_L-1	TICCACCCCTTACACATTCGG	AAGTIGTICAGCAGGCACAC
CR3022 L-2	TGTGCCTGCTGAACAACTTC	TGGAGCTCAGGGAATATGTGC
—		
CR3022_L-3	AGAAGCACAAGGTGTATGCC	ACACTCGCCCCTATTGAAGC
		TTOOTOTTOTOOTOTTOOTO
GAPDH-1	ACGACCACTTIGTCAAGCTC	
GAPDH-2	TCTGACTTCAACAGCGACAC	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC
GAPDH-3	AAAATCAAGTGGGGCGATGC	CAGAGATGATGACCCTTTTGGC
-		

TABELA 3 - RELAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA qPCR

FONTE: O autor (2022).

Para teste com o conjunto de reagentes *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) foram usados os seguintes parâmetros de reação: pré-incubação por 2min a 50 °C; incubação por 2min a 95 °C; duas etapas de amplificação sendo 15seg a 95 °C e 1min a 60 °C (40 ciclos). Para o conjunto de reagentes *Fast Start Essential DNA Green Master* (Roche) foi usado: incubação por 10min a 95 °C; três etapas de amplificação sendo 10seg a 95 °C, 30seg a 60 °C e 30seg a 72 °C (45 ciclos). Os parâmetros para curva de *melting*, para ambos os conjuntos de reagentes, foram: 10seg a 95 °C, 1min a 65 °C e 1seg a 97 °C.

Os dados foram processados pelo programa do próprio equipamento (LightCycler 96 SW 1.1) e a análise da quantificação relativa foi realizada pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), utilizando gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como normalizador. Neste método a razão da expressão é calculada a partir do valor da eficiência de amplificação do gene alvo ( $E_{alvo}$ ), elevado à diferença do valor de Cq ( $\Delta$ Cq) do controle e da amostra testada, dividido pelo valor da eficiência de amplificação do gene normalizador), elevado à diferença do valor de Cq do controle e da amostra testada, conforme equação a seguir:

Razão da expressão = 
$$\frac{(E_{alvo}) \Delta Cq, alvo (controle - amostra testada)}{(E_{normalizador}) \Delta Cq, normalizador (controle - amostra testada)}$$

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO RBD DE SARS-COV-1 E SARS-COV-2

4.1.1 Subclonagem no vetor de expressão pIRES2-EGFP

Os genes codificantes para os RBDs de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2, obtidos em pcDNA3.1, foram subclonados em pIRES2-EGFP a montante de IRES, de modo que o RBD terá sua tradução mediada pelo mecanismo dependente da estrutura *cap* 5' do mRNA, enquanto o início da tradução da eGFP é mediado pelo IRES. A confirmação das subclonagens foi feita, inicialmente, através de análise de restrição do DNA, na qual foi observado migração do fragmento com a mobilidade esperada (Figura 9), e subsequentemente a presença dos insertos nos vetores de expressão pIRES2-EGFP com RBD de SARS-CoV-1 (pIRES2-EGFP-RBD1) e com RBD de SARS-CoV-2 (pIRES2-EGFP-RBD2) foi confirmada por sequenciamento de DNA.



FIGURA 9 - DIGESTÃO CONFIRMATÓRIA DOS VETORES pIRES2-EGFP-RBD1 E pIRES2-EGFP-RBD2

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 0,8% com o vetor pIRES2-EGFP-RBD1 circular (VC) e com digestões confirmatórias com as enzimas *Nhel* (1 – 6060 pb), *Hin*dIII+*Ndel* (2 – 373 pb, 1036 pb e 4651 pb) e *Ndel* + *Bg/*II (3 – 6060 pb) (A); com o vetor pIRES2-EGFP-RBD2 circular (VC) e com digestões confirmatórias com as enzimas *Nhel* (1 – 6111 pb), *Ndel* + *Bg/*II (2 – 938 pb e 5173 pb) (B). M: marcador de massa molecular 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen).

# 4.1.2 Transfecção de células HEK293, ensaios de expressão e seleção clonal

A transfecção dos vetores pIRES2-EGFP-RBD1 e pIRES2-EGFP-RBD2 foi feita utilizando os vetores circulares pela falta de sítio de restrição compatível para linearização. A transfecção foi realizada em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

A evolução das culturas foi acompanhada visualmente em microscópio de fluorescência. Após 24h foi possível observar a presença de células fluorescentes, indicando sucesso da transfecção. No quarto dia (Figura 10A), quando as culturas estavam com confluência superior a 80%, as células foram coletadas e semeadas em Opti-MEM seletivo, contendo 600 µg/mL de G418 para selecionar as células que receberam o vetor contendo a construção de interesse e o gene de resistência à neomicina. A concentração de 600 µg/mL de G418 foi escolhida para uso uma vez que, no teste da concentração necessária para seleção de HEK293, foi a menor concentração testada que causou a morte das células em uma semana após início da adição do antibiótico.

A morte das células do controle (cultura não transfectada) foi constatada no sétimo dia após adição de G418, conforme esperado. Mesmo após a seleção, com a recuperação das células e início da expansão das culturas transfectadas, ainda foi observada a presença de células não fluorescentes (Figura 10B), sugerindo que estas células podem ter incorporado ao seu genoma o cassete de expressão do gene de resistência à neomicina, mas não o cassete de expressão que contém o RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2.

Após expansão da população de células selecionadas com G418 em garrafa de 25 cm<sup>2</sup>, os sobrenadantes das culturas transfectadas foram analisados através de SDS-PAGE e Western blot, para verificar a expressão do RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 secretados no meio de cultivo. Em SDS-PAGE (Figura 10C) não foi visualizada nenhuma banda na altura correspondente a massa molecular do RBD de SARS-CoV-1 (25,3 kDa) e SARS-CoV-2 (27,2 kDa), apenas a banda da albumina presente no SFB, utilizado para suplementar o meio de cultivo. Entretanto, em Western blot utilizando anticorpo que reconhece polihistidina foram detectadas bandas entre 30 e 50 kDa (Figura 10D), porém de baixa intensidade, principalmente para o RBD de SARS-CoV-1.

#### FIGURA 10 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS CULTURAS TRANSFECTADAS COM pIRES2-EGFP-RBD1 E pIRES2-EGFP-RBD2



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B análise da expressão de eGFP por microscopia de fluorescência no quarto dia (A) após a transfecção com pIRES2-EGFP-RBD1 e pIRES2-EGFP-RBD2 e no sétimo dia (B) após a morte do controle por adição de G418. Em C e D: Análise por SDS-PAGE (C) e Western blot (D) do sobrenadante das culturas transfectadas, já selecionadas e expandidas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup>. M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) (C) e *Novex Sharp Pre-stained Protein* (Thermo Fischer Scientific) (D); 1: pIRES2-EGFP-RBD1; 2: pIRES2-EGFP-RBD2; CN: controle negativo – população selvagem. A seta indica altura da banda detectada no Western blot (D).

As células transfectadas foram então submetidas à separação de célula única por citometria de fluxo. Inicialmente foram obtidos 12 clones para o RBD de SARS-CoV-1 e 4 clones para o RBD de SARS-CoV-2, sendo que 4 e 3 clones, respectivamente, mantiveram-se viáveis após a expansão.

A fim de comparar o nível de expressão dos clones, as populações clonais e a população selecionada apenas por antibiótico (população SA) foram semeadas em placa de 6 poços, crescidas por 3 dias e o sobrenadante foi coletado para análise. Em SDS-PAGE (Figura 11A) não foi verificada banda referente às proteínas de interesse, apenas no Western blot (Figura 11B) entre as bandas de 30 e 50 kDa do marcador de massa molecular. O perfil de migração do RBD de SARS-CoV-2 observado em SDS-PAGE, com mobilidade eletroforética acima do esperado para sua massa teórica, condiz com dados da literatura, em que aparece com aproximadamente 35 kDa (Sinegubova et al., 2021 e Tee et al., 2020), em virtude da presença de glicosilação (Sinegubova et al. 2021). Devido à similaridade estrutural entre os RBDs, esta explicação pode ser extrapolada para o RBD de SARS-CoV-1.

Na figura 11B nota-se que o clone E5 apresentou maior expressão entre os clones do RBD de SARS-CoV-1. Com relação ao RBD de SARS-CoV-2, os três clones apresentaram boa expressão comparados com a população da seleção por antibiótico (SA). O clone C4 foi selecionado com base na expansão celular visualizada por microscopia, a qual se mostrou mais uniforme em monocamada, enquanto nos clones B10 e F9 as células se apresentavam aglomeradas.

FIGURA 11 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS POPULAÇÕES CLONAIS DO RBD DE SARS-CoV-1 E SARS-CoV-2



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B análise da expressão do RBD de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2, por SDS-PAGE (A) e Western blot (B), secretados no sobrenadante das culturas das populações clonais. Em C análise da expressão de eGFP do clone E5 – RBD de SARS-CoV-1 e clone C4 – RBD de SARS-CoV-2 por microscopia de fluorescência. M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) em (A) e *Novex Sharp Pre-stained Protein* (Thermo Fischer Scientific) em (B); B10, C4, C10, E5, F9, G2: clones; SA: população selecionada apenas por antibiótico; CN: controle negativo – população não transfectada. A seta indica altura da banda correspondente ao RBD de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2 detectada no Western blot (B).

4.1.3 Teste de enriquecimento da cultura transfectada com pIRES2-EGFP-RBD2 e análise da relação de expressão do RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP

Uma segunda transfecção, seguindo os mesmos parâmetros da primeira, foi realizada com pIRES2-EGFP-RBD2 para verificar se o enriquecimento das culturas transfectadas proporcionaria clones com expressão superior do RBD de SARS-CoV-2. No quarto dia após a transfecção, uma parte das células foi semeada em meio contendo G418 e as células restantes foram submetidas a enriquecimento por citometria de fluxo, sendo coletada apenas a fração de células que representava 10% da população com fluorescência mais intensa. Foi constatado que 24,3% das células em cultura eram eGFP positivas antes do enriquecimento (Figura 12A), subindo para 86,9% após o procedimento (Figura 12B). Cerca de 6 x 10<sup>4</sup> células foram recuperadas e semeadas em placa de 6 poços para seleção com G418. Células não transfectadas também foram semeadas para controle da seleção com o antibiótico.

As culturas foram acompanhadas visualmente em microscópio, verificandose morte da cultura controle após sete dias e também a presença de células não fluorescentes nas culturas da população enriquecida (população E) e da população selecionada com o antibiótico (SA).

Após 38 dias, com a expansão da cultura enriquecida, foi realizada nova análise por citometria de fluxo constatando-se queda superior a 20% na quantidade de células GFP positivas (63,2%). Foi realizada também a separação de células únicas em duas placas de 96 poços.



FIGURA 12 - ENRIQUECIMENTO DA 2ª TRANSFECÇÃO COM pIRES2-EGFP-RBD2



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B: Gráficos gerados a partir da contagem de células eGFP positivas em FACSAria II, pré (A) e pós-enriquecimento (B), da cultura transfectada com pIRES2-EGFP-RBD2. A *gate* P1 foi estabelecida com auxílio da cultura controle – população não transfectada (C) para definir início do sinal de fluorescência equivalente à emissão de GFP.

Os 19 clones obtidos foram transferidos para placa de 24 poços e no quarto dia de crescimento, quando já havia clones em confluência superior a 90%, o sobrenadante foi coletado para análise preliminar por Western blot (Figura 13).

 

 FIGURA 13 – ANÁLISE PRELIMINAR DA EXPRESSÃO DOS CLONES PROVENIENTES DA CULTURA ENRIQUECIDA DA 2ª TRANSFECÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-2

 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

 M 14 15 16 17 18 19

 CN



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Western blot do sobrenadante da cultura celular dos 19 clones obtidos a partir da cultura enriquecida do RBD de SARS-CoV-2 para análise preliminar da expressão. M: marcador de massa molecular *Novex Sharp Pre-stained Protein* (Thermo Fischer Scientific); CN: controle negativo – população não transfectada. A seta indica altura da banda correspondente ao RBD de SARS-CoV-2.

Além das populações E e SA, os clones que apresentaram banda mais intensa na análise preliminar por Western blot (clones 1, 16 e 17) e também apresentavam expansão celular uniforme em monocamada foram selecionados para verificar se havia correlação entre a intensidade de fluorescência de GFP com o nível de expressão do RBD de SARS-CoV-2 usando GAPDH como normalizador. O clone 4, que não apresentou banda no Western blot, foi selecionado para controle.

Uma fração das células, semeadas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em cultura por três dias, foi submetida à análise da intensidade de eGFP no citômetro de fluxo FACScanto (BD) e o restante foi destinado ao preparo de extrato celular para análise por Western blot em paralelo à análise do sobrenadante da cultura celular.

De acordo com a análise no citômetro, a população E apresentou queda de quase 50% de células GFP positivas (32,1%), quando comparada com a leitura realizada no dia da separação de célula única (63,2%). Esse valor obtido foi inferior ao da população SA, 35,9%, mesmo com a população E exibindo maior intensidade média de eGFP (Figura 14B). Todos os clones apresentaram porcentagem de células GFP positivas acima de 97%. A partir da análise da intensidade de fluorescência média de eGFP, verifica-se que o clone 17, além de possuir células com intensidade mais elevada (Figura 14A), também apresenta média de intensidade de fluorescência superior aos demais clones (Figura 14B).

A abundância relativa do RBD de SARS-CoV-2, secretado no sobrenadante da cultura celular, e de eGFP, presente no extrato celular, foi normalizada pela quantidade de GAPDH presente no extrato celular, a partir da intensidade de pixels das bandas reveladas por Western blot (Figura 14C) e mensuradas no programa ImageJ. A análise das bandas (Figura 14D) demonstrou que a população SA possui maior expressão de RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP do que a população E. Também foi verificado que o clone 17 é quem possui maior expressão de eGFP, assim como de RBD de SARS-CoV-2. O clone 1 aparece como segundo clone com maior expressão de RBD de SARS-CoV-2, porém com menor intensidade média (Figura 14B) e menor expressão de eGFP (Figura 14D).

Embora o clone 4 não tenha apresentado banda para o RBD de SARS-CoV-2 quando analisado a partir da cultura em placa de 24 poços (Figura 13), sua expressão foi observada ao se analisar a cultura expandida em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> (Figura 14C e 14D). Isto indica que a expansão das culturas para recipiente de 25 cm<sup>2</sup> se mostrou mais adequada para verificação da expressão.

Em conjunto, os dados obtidos por citometria e análise por Western blot indicam que após o enriquecimento a porcentagem de células GFP positivas não se manteve estável, apresentando porcentagem inferior à população selecionada apenas por antibiótico (SA) e, também, que o enriquecimento não proporcionou aumento relevante na intensidade de fluorescência e nem na produção do RBD de SARS-CoV-2.





FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A sobreposição das leituras de fluorescência realizadas no citômetro FACScanto (gráfico gerado no programa Flow Jo). Em B comparativo da intensidade média de eGFP lida no citômetro FACScanto. Em C Western blot para detecção do RBD de SARS-CoV-2, eGFP e GAPDH. Em D quantificação das bandas de eGFP e RBD de SARS-CoV-2 utilizando GAPDH como normalizador. C1, C4, C16 e C17: clones; E: população enriquecida; SA: população selecionada apenas com G418; CN: controle negativo – população selvagem.

O enriquecimento da população transfectada através de citometria é relatado por Kim et al. (2012) como uma etapa que permite a obtenção de população, e posterior seleção de clones, com maior nível de expressão proteica. Entretanto, apesar do enriquecimento ter elevado o número de células GFP positivas, nossos resultados indicam que pode não haver relação direta entre a intensidade/expressão de eGFP e a produção do RBD de SARS-CoV-2. A população enriquecida ainda apresentou células não fluorescentes e não se manteve estável quanto a porcentagem de células fluorescentes, perdendo quantidade de células eGFP positivas ao longo das semanas. Para gerar uma população com porcentagem estável de células fluorescentes talvez seja necessário mais rodadas de enriquecimento, além de seleção mais restringente, coletando-se 1% (Kim et al., 2012) da população que equivale às células com fluorescência mais intensa.

Com a finalidade de explorar melhor a possível relação entre expressão de eGFP e do RBD de SARS-CoV-2 e, também, de verificar se os clones selecionados a partir da população E apresentam maior nível de expressão do RBD de SARS-CoV-2 em comparação com clone selecionado a partir da população SA da primeira transfecção, foi conduzido um novo experimento de quantificação em triplicata. Para tal foi incluída a população E, os clones C1 e C17 provenientes desta população e o clone C4 obtido a partir da população SA da primeira transfecção. A intensidade das bandas obtidas no Western blot (Figura 15A) foi mensurada através do programa ImageJ e os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism versão 9.0.0.

Nota-se que o crescimento médio das culturas se manteve aproximado (Figura 15B), indicando que não há crescimento privilegiado entre as populações e sugerindo que a inserção genômica ocorreu em locais não prejudiciais à proliferação celular.

Embora o clone C4, proveniente da população SA da primeira transfecção, e C17, da população E da segunda transfecção, tenham apresentado certa correspondência entre nível da produção do RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP (Figura 15C), ao comparar as médias de expressão proteica das quatro populações analisadas foi verificado que não há uma correlação estatisticamente significativa entre o nível de expressão do RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP, com valor de *p* igual a 0,2426 para  $\alpha$  igual a 0,05 (Figura 15D).

Assur et al. (2007), a partir de experimento de co-transfecção em HEK293, utilizando plasmídeos onde as cadeias leve e pesada do Fab de anticorpos está acoplada a proteínas fluorescentes através de um elemento IRES, relatou que a expressão do Fab estava correlacionada com o nível de fluorescência. Nossa investigação a respeito dessa associação não se baseou só na análise qualitativa de visualização da fluorescência em microscopia, mas na análise quantitativa a partir da normalização da expressão das proteínas de interesse por GAPDH, expresso constitutivamente nas células de mamífero. Embora a intensidade de fluorescência de eGFP possa ser indicativo inicial da expressão do RBD de SARS-CoV-2, não foi constatada correlação estatisticamente significativa entre o nível das duas

expressões (para α=0,05). Ainda que os genes que flanqueiam IRES sejam transcritos em um único mRNA, a tradução ocorre de forma independente (Renaud-Gabardos, 2015).

Diferentemente de Kaufman et al. (2008), que relata que os clones obtidos de população selecionada com G418 apresentaram fraco ou nenhum sinal para GFP, não sendo possível isolar clone com expressão uniforme, nossos resultados indicam que a seleção apenas por antibiótico, além de gerar clones com alto sinal para GFP, é suficiente para obtenção de clones com elevada produção proteica. Comparando as populações clonais, C4 e C17, em teste T não pareado, verificou-se que não há diferença significativa da expressão do RBD de SARS-CoV-2 entre elas, para  $\alpha$  igual a 0,05 e intervalo de confiança de 95%, com valor de *p* igual a 0,8984 (Figura 15E). O que indica que a geração de clones com alto nível de expressão não necessita do procedimento de enriquecimento populacional de células GFP positivas, podendo ser alcançada apenas com a pressão de seleção do antibiótico.



FIGURA 15 - NÍVEL DE PRODUÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-2 E CORRELAÇÃO COM eGFP

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A Western blot para detecção do RBD de SARS-CoV-2, eGFP e GAPDH. Em B comparação do crescimento das culturas. Em C comparação da expressão de eGFP e RBD de SARS-CoV-2 normalizadas utilizando GAPDH. Em D teste de correlação entre o nível de expressão do RBD de SARS-CoV-2 e de eGFP, para  $\alpha$ =0,05. Em E gráfico de estimativa entre as médias de expressão de RBD de SARS-CoV-2 dos clones C17 e C4, para  $\alpha$ =0,05 e intervalo de confiança de 95%. M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* pré-corado (BioRad).C: clone; E: população enriquecida.

### 4.1.4 Purificação por cromatografia de afinidade a níquel imobilizado

Para avaliar a quantidade dos RBDs foi feito inicialmente um teste de enriquecimento utilizando resina de níquel imobilizado a partir do sobrenadante das culturas do clone E5 do RBD de SARS-CoV-1 e do clone C4 do RBD de SARS-CoV-2 (proveniente da primeira transfecção).

Através deste enriquecimento, os RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 foram observados nas frações de eluição com imidazol, tanto por coloração direta do gel de poliacrilamida com azul de Coomassie, como em Western blot utilizando anticorpo contra polihistidina (Figura 16). As bandas correspondentes às proteínas presentes no SFB, presentes acima de 50 kDa, não foram eficientemente removidas durante o teste de enriquecimento, indicando a necessidade de se fazer a etapa de lavagem com volume de tampão superior ao utilizado.

FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RBD DE SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 ATRAVÉS DE ENRIQUECIMENTO POR CAPTURA EM RESINA DE NÍQUEL



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B enriquecimento do RBD SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 através de captura em resina de níquel analisado por SDS-PAGE (A) e por Western blot (B). Em azul estão destacadas as bandas referentes ao RBD de SARS-CoV-1 e em laranja ao RBD de SARS-CoV-2 (A). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) em (A) e *Novex Sharp Pre-stained Protein* (Thermo Fischer Scientific) em (B); NL: não ligado; L: lavagem; E1, E2, E3 e E4: frações eluídas com imidazol; R: resina.

Com base no resultado do teste de enriquecimento dos RBDs utilizando níquel, os clones E5 do RBD de SARS-CoV-1 e C4 do RBD de SARS-CoV-2, obtidos na primeira transfecção e selecionados por apresentarem maior expressão, foram expandidos para purificação de maior quantidade dos RBDs e o meio foi coletado periodicamente. Pelo grande volume de trabalho, esta atividade foi

realizada em conjunto com a Dra Dayane Sereno Baêta Rodrigues, pós-doutoranda do grupo de pesquisa.

Para purificação do RBD de SARS-CoV-1 a partir do clone E5, o volume de 213 mL do sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel imobilizado, sendo coletadas frações de 1,3 mL na etapa de eluição da proteína. As frações de eluição 43-54, que abrangem o pico de absorbância em 280 nm gerado no cromatograma (Figura 17A), foram analisadas em SDS-PAGE. Nota-se que as frações 46-53 apresentaram banda na altura esperada (Figura 17B).

Para purificação do RBD de SARS-CoV-2 a partir do clone C4 a cromatografia de afinidade foi realizada com volume de 318 mL de sobrenadante da cultura, sendo coletadas frações de 1,5 mL. As frações de eluição 45-54, que se encontram no maior pico de absorbância em 280 nm gerado no cromatograma (Figura 17C), apresentaram banda na altura esperada para o RBD de SARS-CoV-2 quando analisadas em SDS-PAGE (Figura 17D).

A cromatografia por afinidade à níquel se mostrou eficiente para obtenção de amostras puras dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, visto a ausência de bandas extras no SDS-PAGE, e apresentou rendimento suficiente para realização das análises de validação de anticorpos. Purificações posteriores, com troca para o tampão de fosfato de sódio 20 mM e 100 mM NaCI em cromatografia de exclusão molecular, foram realizadas pelo grupo de pesquisa, obtendo rendimento aproximado de 2 mg dos RBDs de SARS-CoV-1 e de SARS-CoV-2 por litro de sobrenadante de cultura celular purificado.

O perfil eletroforético dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 observado em SDS-PAGE, com mobilidade mais lenta do que o esperado para suas massas moleculares, se manteve como o esperado em aproximadamente 35 kDa, conforme dados obtidos por purificação em pequena escala e também de acordo com a literatura (Sinegubova et al., 2021 e Tee et al., 2020).



FIGURA 17 - PURIFICAÇÃO DO RBD DE SARS-CoV-1 EXPRESSO A PARTIR DO CLONE E5 E DO RBD DE SARS-CoV-2 A PARTIR DO CLONE C4

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e C cromatograma da purificação do RBD de SARS-CoV-1 a partir do clone E5 (A) e do RBD de SARS-CoV-2 a partir do clone C4 (C). A linha azul indica absorbância em 280 nm e a verde o gradiente de imidazol. Em B e D SDS-PAGE das frações 43-54 do pico de eluição do RBD de SARS-CoV-1 (B) e das frações 44-57 referente ao pico de eluição do RBD de SARS-CoV-2 (D). Asterisco (\*) indica o pico de eluição nas cromatografias (A e C). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* não corado (BioRad).

Os plasmídeos pIRES2-EGFP-RBD1 e pIRES2-EGFP-RBD2 não possuem região de homologia específica conhecida com as sequências do genoma humano. Embora a integração genômica na ausência de regiões de homologia seja aleatória, onde a maioria dos eventos é improdutivo, visto que apenas uma pequena fração do genoma é ativo transcricionalmente (Magistrelli et al., 2017), considerando os níveis de expressão do RBD de SARS-CoV-1 e do RBD de SARS-CoV-2 após o longo período em cultura interpretamos como tendo sido obtidos clones de expressão estável. Isso porque os clones gerados a partir de uma única célula foram expandidos até atingirem confluência em garrafas de 300 cm<sup>2</sup>, para purificação repetida dos RBDs a partir de volumes variando entre 200 e 300 mL de sobrenadante, sendo que a célula HEK293 não contém o antígeno T do SV40 (Tan et al., 2021), não suportando a replicação epissomal do plasmídeo pIRES2-EGFP.

A produção do RBD de SARS-CoV-2 em células HEK293 tem sido amplamente realizada por meio de transfecções transientes, com culturas em suspensão (Castro et al, 2021; Mehalko et al., 2021; Tee et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Apesar da transfecção transiente apresentar vantagens como facilidade e rapidez na expressão proteica, as linhagens celulares estáveis obtidas, além de expressar maior nível de proteína do que as populações não clonais, servem como fonte contínua de RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 em conformação nativa, dispensando a repetição de procedimentos de transfecção para obtenção das proteínas.

### 4.2 EXPRESSÃO RECOMBINANTE DO FAB CR3022

## 4.2.1 Otimização do vetor pcDNAmod e montagem do vetor pcDNAmod-eGFP-CR3022HL

Para a expressão das duas cadeias do Fab CR3022 foi utilizada a abordagem de co-expressão das cadeias em vetor único, contendo um cassete de expressão para a cadeia pesada e outro para a cadeia leve. Para tal foi realizada a otimização do plasmídeo pcDNAmod, para inserir a sequência codificadora da eGFP no cassete de expressão da cadeia pesada do Fab. Para isso, um fragmento de DNA codificando o sítio de protease TEV e eGFP, amplificado por PCR (Figura 18A), foi inserido de modo a ficar a montante da decahistidina. A montagem final do vetor com os dois cassetes de expressão requer a construção de dois vetores intermediários, um com o cassete de expressão da cadeia pesada.

Assim, após a inserção do fragmento TEV-eGFP, foi gerado o vetor intermediário pcDNAmod-eGFP-CR3022H, através da subclonagem da cadeia pesada do Fab (CR3022H) à montante de TEV-eGFP. Posteriormente, o cassete de expressão contendo a cadeia leve (CR3022L), presente em outra cópia de pcDNAmod, foi subclonado no vetor intermediário, formando o vetor de expressão pcDNAmod-eGFP-CR3022HL (Figura 18B). A verificação das subclonagens foi realizada por análise de restrição com as enzimas *Xba*I e *Spe*I, *Eco*RI e *Pst*I, que confirmam a presença dos cassetes de expressão contendo os fragmentos de tamanho esperado (Figura 18C).



#### FIGURA 18 - OBTENÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pcDNAmod-eGFP-CR3022HL

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de PCR TEV-eGFP de 794 pb. Em B e C eletroforese em gel de agarose 0,8% com vetor pcDNAmod-EGFP-CR3022HL circular (VC) e as digestões confirmatórias com as enzimas *Xba*I+*Spe*I (1 – 5316 pb e 3718 pb), *Eco*RI (2 – 6001 pb e 3033 pb) e *Pst*I (3 – 4143 pb, 2757 pb, 1621 pb, 285 pb, 228 pb). Em D esquema do vetor de expressão pcDNAmod-EGFP-CR3022HL construído com o programa SnapGene (GLS Biotech), contendo os sítios de clivagem das enzimas usadas na digestão confirmatória. M: marcador de massa molecular 1 *Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen).

# 4.2.2 Transfecção do pcDNAmod-eGFP-CR3022HL em células HEK293, ensaios de expressão e seleção clonal

Para transfecção, o vetor de expressão pcDNAmod-eGFP-CR3022HL foi digerido com a enzima *Bsp*HI, removendo-se 1008 pb da região de expressão do gene *Amp*R, resultando em vetor linear com 8047 pb. A transfecção foi realizada em garrafa de 75 cm<sup>2</sup>. No quarto dia após a transfecção não foi visualizada fluorescência na análise por microscopia, no entanto foi dado seguimento aos ensaios de expressão e enriquecimento. O sobrenadante da cultura celular foi coletado para análise por SDS-PAGE e Western blot e 1 x 10<sup>5</sup> células foram semeadas em placa de 6 poços para seleção com G418 (população SA) e o restante foi submetido ao enriquecimento no citômetro FACSAria II. Com a seleção de células que representavam 10% da população com fluorescência mais intensa, foi
recuperado um total de 1,5 x 10<sup>5</sup> células (população E), as quais foram semeadas em placa de 6 poços para seleção com G418.

Para avaliar a expressão foi realizado um teste de enriquecimento do sobrenadante da cultura, sendo o Fab CR3022 purificado por gravidade em resina de níquel. Embora não tenha sido visualizada fluorescência por microscopia, é possível verificar no SDS-PAGE a presença de bandas com os tamanhos esperados (Figura 19A), confirmadas por Western blot para todas as frações eluídas com imidazol (Figura 19B). A cadeia pesada fusionada com eGFP possui massa molecular calculada de 54,7 kDa, enquanto a cadeia leve possui 27,5 kDa.

FIGURA 19 - EXPRESSÃO DO Fab CR3022 QUATRO DIAS APÓS TRANSFECÇÃO COM pcDNAmod-eGFP-CR3022HL



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B sobrenadante da cultura celular no quarto dia após a transfecção com pcDNAmod-eGFP-CR3022HL analisado por SDS-PAGE (A) e por Western blot (B). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) não corado em (A) e pré corado em (B); NL: não-ligado; L: lavagem; E: eluição com imidazol; R: resina. Setas indicam cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) e cadeia leve (CL).

Após seleção das culturas SA e E com G418 e expansão populacional, foi realizada separação de célula única, obtendo 47 clones a partir da população E e 56 clones da população SA. Os 5 primeiros clones que atingiram confluência foram expandidos em garrafa de 25 cm<sup>2</sup>, para ensaios de expressão após três dias de cultivo.

No vetor pcDNAmod-eGFP-CR3022HL o gene para eGFP está fusionado à sequência que codifica a cadeia pesada do Fab, sendo ambos secretados após a síntese, o que confere menor fluorescência às células em comparação à expressão utilizando o vetor pIRES2-eGFP, cuja expressão da eGFP é intracelular. Nesse sentido, o acompanhamento da transfecção por microscopia de fluorescência antes

da seleção não se mostrou eficiente. Todavia, após a seleção dos transfectantes é possível observar fluorescência no citoplasma das células (Figura 20E), servindo como referência para acompanhamento da expressão da cadeia pesada nos clones. Graças ao acúmulo da CH-eGFP secretada pela célula também é possível realizar a análise de fluorescência do sobrenadante.

A partir do escaneamento dos sobrenadantes celulares no equipamento iBright, foi visualizado maior intensidade de fluorescência para o clone E2 (proveniente da população SA), seguido pelo clone F11 (população SA) e B10 (população E) (Figura 20A). Este resultado foi corroborado quantitativamente pela análise dos dados obtidos no leitor de placas Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek) (Figura 20B). A análise da expressão por Western blot (Figura 20C) e a análise da razão por GAPDH (Figura 20D) além de demonstrarem essa mesma relação entre os clones, evidenciam que, diferente dos demais clones, G9 apresenta maior expressão de CL em comparação com CH.

Segundo Bhoskar et al. (2013), a expressão CH e CL de IgG não ocorre de forma estequiométrica, sendo CL expressa em excesso molar no retículo endoplasmático e necessária para montagem e liberação do anticorpo. Além disso, a elevada expressão de CL, de acordo com os autores, se correlaciona com elevada produtividade de anticorpo monoclonal. No entanto a CH é secretada da célula apenas na presença de CL, sendo ainda que o domínio constante 1 da CH só é dobrado quando pareado com CL dobrada, enquanto CL livre é observada em cultura celular (Bhoskar et al., 2013; Feige et al., 2009).

Entre os clones analisados seis apresentaram expressão elevada da cadeia pesada (CH) em relação à cadeia leve (CL) do Fab CR3022, sendo E2 o clone com maior expressão, seguido por F11 e B10, conforme verificado também a partir da intensidade de fluorescência no sobrenadante celular. Este resultado foi, de certa forma inesperado, visto que os dois cassetes de expressão possuem os mesmos elementos regulatórios para transcrição e foram transfectados no mesmo DNA. A diferença de expressão verificada entre os clones poderia ser explicada pelo número de eventos de inserção e/ou pelo local de inserção no genoma, uma vez que o evento ocorre de modo não direcionado, podendo ou não ser em uma região transcricionalmente ativa (Magistrelli et al., 2017). O clone G9, distintamente, apresentou maior nível de expressão da cadeia leve em relação à cadeia pesada. Neste contexto mostrou-se interessante comparar o rendimento do anticorpo

montado expresso pelos clones E2 e G9 e investigar a origem dessa desproporção na expressão.



# FIGURA 20 - ANÁLISE DA INTENSIDADE DE eGFP E DA EXPRESSÃO DO Fab CR3022 NOS CLONES GERADOS

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B Análise da intensidade de fluorescência dos sobrenadantes das culturas celulares por visualização no escâner iBright (A) e por leitura no Synergy H1 Hybrid Reader (B). Em C e D análise da expressão das cadeias pesada (CH) e leve (CL) do Fab CR3022 por Western blot (C) e quantificação normalizada por GAPDH das bandas (D). Em E análise de células dos clones E2 e G9 em microscópio LEICA DMi8; à direita imagem de campo claro e a esquerda imagem de fluorescência. R: réplica; E: população enriquecida; SA: população selecionada apenas por G418; CN: controle negativo – população não transfectada.

4.2.3 Análise da expressão do Fab CR3022 a partir dos clones E2 e G9

Visto que há divergência na proporção de expressão de CH e CL entre os clones E2 e G9, foi feito um experimento de purificação para avaliar o rendimento a

partir do volume de 150 mL de sobrenadante proveniente de cultura celular de 4 dias de cada um destes clones.

As purificações foram feitas através de cromatografia de afinidade à níquel imobilizado, as quais foram bastante eficientes, embora algumas bandas contaminantes com menor intensidade podem ser vistas na análise em SDS-PAGE. Considerando o perfil cromatográfico e a análise em SDS-PAGE, nota-se para o clone E2 pico maior e bandas mais intensas em relação ao clone G9, indicando maior rendimento da expressão do Fab CR3022 para o clone E2 (Figura 21).





FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e C cromatograma da purificação dos clones E2 (A) e G9 (C). Linha azul indica absorbância em 280 nm e verde o gradiente de imidazol. Em B e D SDS-PAGE das frações 37-47 do pico de eluição do clone E2 (B) e das frações 35-44 referente ao pico de eluição do clone G9 (D). Asterisco (\*) indica o pico de eluição do Fab CR3022. M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* não corado (BioRad); PC: pré-coluna; NC: não ligado; L: lavagem. Setas indicam cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) e cadeia leve (CL).

As seis frações da purificação que apresentaram maior quantidade de Fab CR3022 (40-45 para E2 e 37-42 para G9) foram concentradas e submetidas a análise por cromatografia de exclusão molecular. Assim como na cromatografia de afinidade, na cromatografia de exclusão molecular as bandas de CH-eGFP e CL co-

eluem no mesmo pico, confirmando a estabilidade do Fab CR3022, o qual também foi obtido com maior pureza para a análise de funcionalidade. Nota-se que o clone E2 apresentou rendimento maior do Fab CR3022, cuja quantificação revelou um rendimento de 264 µg para o clone E2 contra 51 µg para o clone G9 para os 150 mL de sobrenadante de cultura utilizado na purificação (Figura 22).



FIGURA 22 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DO Fab CR3022 PREVIAMENTE PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DOS CLONES E2 E G9

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e C cromatograma da exclusão molecular do Fab CR3022 purificado do clone E2 (A) e purificado do clone G9 (C). A linha azul indica absorbância em 280 nm. Em B e D SDS-PAGE das frações 22-32 referentes ao pico de absorbância em 280nm do clone E2 (B) e das frações 17, 19, 21-31 do Clone G9 (D). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* não corado (BioRad); PC: pré-coluna. Setas indicam cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) e cadeia leve (CL).

Na cromatografia por afinidade a níquel a purificação do Fab com a resina ocorre através da interação da decahistidina que está presente em CH-eGFP, nesse sentido toda cadeia leve não associada à cadeia pesada sai nas frações anteriores à eluição com imidazol. Quando essas frações for analisadas por Western blot, foi constatado que o clone G9, mas não E2, apresentou CL livre na fração do não ligado (NL) e da lavagem (L) na etapa de cromatografia de afinidade, indicando maior expressão de CL no clone G9 (Figura 23).

FIGURA 23 – ANÁLISE DA PRESENÇA DA CL NAS FRAÇÕES ANTERIORES A ELUIÇÃO COM IMIDAZOL NA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DO Fab CR3022 DOS CLONES E2 E G9



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B frações da cromatografia de afinidade do Fab CR3022 dos clones E2 e G9 analisado por SDS-PAGE (A) e por Western blot (B). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) não corado em (A) e pré corado em (B); PC: pré-coluna; NL: não ligado; L: lavagem; P: proteína purificada (diluição 1:10 da concentração pós exclusão molecular). Setas indicam cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) e cadeia leve (CL).

Diferente do relatado na literatura para o IgG (Bhoskar et al., 2013), nossos resultados da purificação do Fab mostram que o clone E2 apresentou expressão estequiométrica das cadeias, onde toda CH e CL secretadas estariam associadas formando o Fab. A elevada expressão de CL, em relação à CH, no caso do clone G9, não representou maior produtividade do Fab, todavia outros clones deveriam ser analisados para verificar a representatividade da expressão de CL na montagem do Fab naqueles clones cuja expressão de CH é aparentemente maior.

Sabendo que E2 possui maior produtividade do Fab, nosso próximo questionamento foi com relação à origem da desproporção de expressão da CH e CL observada para o clone G9. Nesse sentido realizamos análises para verificar o nível de transcrição de CH e CL e os eventos de inserção no genoma de ambos os clones.

### 4.2.4 Análises por PCR quantitativa

As análises do nível de transcrição e do número de cópias de CH e CL presente nos clones E2 e G9 foram realizadas por PCR quantitativa. Além dos clones E2 e G9, analisamos também o clone F6, que apresentou expressão superior da CH em relação a CL, assim como o clone E2, porém em menor intensidade, para termos mais um ponto de referência. Como controle utilizamos a população SA, a

partir da qual foram isolados os clones testados, e como normalizador usamos o gene GAPDH.

Para verificar o nível de transcrição foi utilizado como molde o cDNA obtido por transcrição reversa, utilizando oligo (dT), a partir do RNA total extraído das células testadas (Figura 24A). Para o número de cópias foi utilizado DNA genômico (Figura 24B e 24C).



FIGURA 24 – RNA TOTAL E DNA GENÔMICO EXTRAÍDOS PARA qPCR

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A gel de agarose 1% para análise do RNA total extraído dos clones E2, F6 e G9 e da população SA. Em B e C gel de agarose 0.8% para análise do DNA genômico extraído com reagente TRizol (Invitrogen) (B) e extraído com kit QIAamp DNA mini (QIAGEN) e tratado com RNase A (C). M: marcador de massa molecular *Lambda* DNA/*Hin*dIII (New England BioLabs).

# 4.2.4.1 Otimização das reações de qPCR

O teste dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizado com a população SA, estabelecida como controle (Figura 25). Para curva padrão foram utilizados sete pontos de diluição de fator 2x do gDNA, partindo da diluição 1:4. Para reação de quantificação foi utilizado 2 µl de cDNA e 20 ng de DNA.



FIGURA 25 – TESTE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES EM REAÇÃO DE qPCR

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Perfil de amplificação das reações de qPCR, seguido pelas respectivas curvas de *melting*, da população SA com os três pares de oligonucleotídeos desenhados (1, 2 e 3) para cadeia pesada (CH), cadeia leve (CL) e GAPDH, utilizando gDNA para curva padrão. Dados do cDNA em lilás e do gDNA em vermelho. A amplificação dos sete pontos de diluição da curva padrão está representada em ciano e o controle negativo em preto.

Nota-se que a curva padrão realizada com gDNA da população SA, contemplou o ciclo de quantificação (Cq) da amostra de gDNA teste, porém não contemplou Cq da amostra de cDNA, isso para todos os iniciadores testados. Buscando maior abrangência da curva padrão foi realizado teste com cDNA da população SA, sendo sete pontos de diluição de fator 3x, partindo da diluição 1:3 e utilizando apenas o conjunto 3 dos iniciadores (Figura 26). Como resultado obtivemos uma curva padrão contemplando Cq tanto da amostra de gDNA quanto de cDNA, definindo o uso do cDNA para realização da curva padrão nas reações de quantificação.



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Perfil de amplificação das reações de qPCR, seguido pelas respectivas curvas de *melting*, da população SA com o par de oligonucleotídeo número 3 para cadeia pesada (CH), cadeia leve (CL) e GAPDH, utilizando cDNA para curva padrão. Dados do cDNA em lilás e do gDNA em vermelho. A amplificação dos sete pontos de diluição da curva padrão está representada em ciano e o controle negativo em preto.

A fim de aumentar o intervalo de confiança dos resultados, aumentamos a concentração das amostras de DNA para 3x (60 ng) e 6x (120 ng). Como resultado obtivemos queda relevante do Cq comparado com o valor obtido na reação inicial com 20 ng, tendo sido definida a quantidade de 120 ng de DNA para reações de quantificação (Tabela 4).

TABELA 4 – Cq OBTIDO COM AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE gDNA NA qPCR

-	CH_3	CL_3	GAPDH_3
20 ng de gDNA	24,82	27,32	19,77
60 ng de gDNA	23,46	26,67	18,22
120 ng de gDNA	22,74	26,21	17,48

FONTE: O autor (2022).

Com base na eficiência de reação e no coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) (Tabela 5) obtidos no teste dos oligonucleotídeos e, também no perfil de amplificação (Figura 25), foram selecionados os iniciadores CH\_3, CL\_1 e GAPDH\_3 para realizar a quantificação do nível de transcrição e do número de cópias dos clones testados.

Oligonucleotídeo	Eficiência	R <sup>2</sup>
CH_1	3,66	0,97
CH_2	2,20	0,99
CH_3	2,24	0,98
CL_1	2,90	0,78
CL_2	3,25	0,63
CL_3	3,45	0,56
GAPDH_1	2,17	1,00
GAPDH_2	2,12	1,00
GAPDH_3	2,09	1,00

TABELA 5 – EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES DE qPCR

FONTE: O autor (2022).

# 4.2.4.2 Quantificação do nível de transcrição por qPCR

Com os parâmetros determinados no processo de otimização, foi realizada reação de quantificação do nível de transcrição do Fab CR3022 para os clones E2, F6 e G9 com o objetivo de comparar os níveis de mRNA com a quantidade de CH e CL detectadas por Western bot. A quantificação utilizando o conjunto de reagentes *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) revelou mais transcritos de CL do que de CH sendo que os clones G9 e E2 apresentaram os maiores níveis de transcritos de CL e CH, respectivamente (Figura 27A).

Frente a este resultado, repetimos a reação de quantificação utilizando o conjunto de reagentes *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) fornecidos pelo mesmo fabricante do equipamento de qPCR utilizado, incluindo três placas réplicas. O resultado obtido para CH e CL manteve a mesma relação e proporção obtida anteriormente (Figura 27B).



### FIGURA 27 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DAS CADEIAS PESADA E LEVE

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B análise da quantificação do nível de transcrição das cadeias pesada (CH) e leve (CL) utilizando os conjuntos de reagentes *SYBR Select Master Mix* – Thermo Fisher Scientific (A) e *FastStart Essential DNA Green Master* – Roche (B) nas reações de qPCR. A análise foi feita pelo método Pfaffl. A população SA foi utilizada como controle para os clones testados e o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

A partir da análise em gel de agarose, embora os dois conjuntos de reagentes tenham apresentado resultados semelhantes, nota-se que houve amplificação inespecífica quando utilizado o conjunto *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche). Para o conjunto de reagentes *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) amplificações inespecíficas não são observadas, validando o experimento (Figura 28).

Naderi et al. (2018), a partir da quantificação por RT-PCR, relatam uma clara relação entre o nível de mRNA das cadeias e o rendimento do anticorpo. Nesse estudo todos os oito clones analisados, quatro provenientes de transfecção controle

e quatro de transfecção teste, apresentaram similaridade do nível de expressão relativa de mRNA entre as cadeias CH e CL. Com objetivo de verificar o efeito de um isolador de DNA na expressão do anticorpo, os autores realizaram transfecção de células CHO com vetor único contendo cassetes de expressão individuais para CH e CL, assim como o realizado no nosso trabalho.

Nossos resultados, similares para os dois conjuntos de reagentes utilizados na quantificação por PCR, mostram relação proporcional entre os resultados de quantificação de mRNA obtidos e o nível de expressão de CH e CL observado para os clones E2 e G9. No entanto há uma diferença expressiva entre o nível de transcrição observado para CH e CL, para ambos os clones. Conforme sugerido por Schlatter et al. (2005), CL apresentaria transcrição e tradução mais rápida por apresentar sequência menor e o excesso de CL poderia ser degradado antes da exportação. Nossos resultados também mostram que o nível de transcrição de CH corresponde melhor ao rendimento do Fab. Esta observação se mostra concordante com o relatado por Jiang et al. (2006) e Lee et al. (2009), onde a alta produtividade do anticorpo está correlacionada mais especificamente com o nível de transcrição de CH.

### FIGURA 28 – ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE mRNA



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Gel de agarose 2% para análise dos produtos das reações de qPCR com cDNA. 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente clones E2, F6 e G9 e população SA, representados em verde para *SYBR Select Master Mix* – Thermo Fisher Scientific e em azul para *FastStart Essential DNA Green Master* – Roche; 5-11, em Iaranja, representam as diluições da curva padrão; 12, em preto, representa o controle negativo. M: marcador de massa molecular *Lambda* DNA/*Hin*dIII (New England BioLabs).

### 4.2.4.3 Quantificação do número de inserções genômicas por qPCR

O número de inserções genômicas foi verificado na tentativa de encontrar a origem da desproporção de expressão da cadeia leve e pesada entre os clones E2 e G9. Assim como na análise do mRNA, na análise do gDNA também foi verificado diferença no resultado obtido com os dois conjuntos de reagentes utilizados (Figura 29).

Com o conjunto *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) obtivemos resultado discrepante com relação ao número de inserções de CH e CL. Enquanto para a CH a quantificação revelou valores em torno de 1 a 2,5 cópias para a CL foram detectadas 12 cópias para o clone E2 e cerca de 7 e 5,5 para os clones F6 e G9, respectivamente, que para ser real requer que teriam ocorrido mais eventos de inserção para CL do que para CH. Este resultado diverge do esperado devido ao fato de que os dois cassetes de expressão foram transfectados usando um único vetor. Por outro lado, com o conjunto de reagentes *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) foi verificado resultado mais coerente com o esperado, onde o número de eventos de inserção CH e CL são próximos, com os clones F6 e G9 apresentando o mesmo número de inserções que a população SA e o clone E2 apresentando o dobro de inserções.

Embora o resultado obtido com o conjunto de reagentes *SYBR Select Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) não esteja em concordância com o esperado, a análise da curva de *melting* e o perfil eletroforético das amplificações indicam que o experimento é válido. Enquanto o uso do conjunto de reagentes *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche), que exibiu resultado que explicaria o maior nível de expressão proteica do clone E2, apresentou amplificações inespecíficas. Nestas análises nota-se também que os oligonucleotídeos testados para GAPDH não são ideais, apresentando hibridizações inespecíficas (Figura 30).

Se considerados os resultados obtidos para quantificação do mRNA e os obtidos com o conjunto de reagentes *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) para quantificação dos eventos de inserção no genoma, podemos inferir que a origem da desproporção de expressão de CH e CL observada entre os clones E2 e G9 está no processo de transcrição. Todavia, visto as hibridizações inespecíficas dos iniciadores, inclusive para o gene controle GAPDH, é necessário realizar novos testes com oligonucleotídeos apropriados.



### FIGURA 29 – EVENTOS DE INSERÇÃO GENÔMICA DAS CADEIAS PESADA E LEVE

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B análise da quantificação de eventos de inserção genômica das cadeias pesada (CH) e leve (CL) utilizando os conjuntos de reagentes *SYBR Select Master Mix* – Thermo Fisher Scientific (A) e *FastStart Essential DNA Green Master* – Roche (B) nas reações de qPCR. A análise dos dados foi feita pelo método Pfaffl. A população SA foi utilizada como controle para os clones testados e o gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

### FIGURA 30 – ANÁLISE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DOS EVENTOS DE INSERÇÃO GENÔMICA



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Gel de agarose 2% para análise dos produtos das reações de qPCR com gDNA. 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente clones E2, F6 e G9 e população SA, apresentados em verde para os conjuntos de reagentes *SYBR Select Master Mix* – Thermo Fisher Scientific e em azul para *FastStart Essential DNA Green Master* – Roche; 5-11, em laranja, representam as diluições da curva padrão; 12, em preto, representa o controle negativo. M: marcador de massa molecular *Lambda* DNA/*Hin*dIII (New England BioLabs).

Hussain et al. (2021) relatam que em casos de integração aleatória no genoma celular percebe-se ausência de correlação entre o número de cópias do DNA integrado e a produtividade específica, que se deve a diferente taxa de transcrição dependente do local de inserção. E, assim como observado nos nossos resultados, Hussain et al. (2021) também relatam a falta de correlação entre o número de cópias de DNA e o nível de transcrição.

Ante ao exposto, considerando que observamos resultado não concordante para o número de inserções genômicas e o nível de transcrição, porém observamos certa concordância entre nível de transcrição e o nível de expressão das cadeias pesada e leve dos clones E2 e G9, podemos levantar a hipótese de que a origem da variação de expressão das cadeias entre os clones seja a nível transcricional.

# 4.2.5 Análise da interação do Fab CR3022 com o RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2

Para verificar a funcionalidade das proteínas recombinantes produzidas neste trabalho, realizamos teste de interação do Fab CR3022 com os RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 por meio de ensaios de ELISA indireto. O anticorpo CR3022 foi isolado de paciente convalescente de SARS (Ter Meulen et al., 2006) e devido à conservação da maioria dos resíduos que formam epítopo que ele reconhece, o CR3022 também interage com o RBD de SARS-CoV-2, porém com menor afinidade, apresentando K<sub>D</sub> de 1 nM para o RBD de SARS-CoV-1 e 115 nM para o RBD de SARS-CoV-2 (Yuan et al., 2020).

Um ensaio preliminar foi realizado com a imobilização de 850 ng dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 utilizados como antígenos e quantidades teste de 2 µg, 1 µg e 0,5 µg do Fab CR3022, purificado do clone E2. Com estas três quantidades testadas houve saturação da interação (Figura 31A), tendo sido necessário diminuir a quantidade de ambos os componentes utilizados no ELISA.

Para titulação dos antígenos, foram imobilizadas cinco quantidades diferentes dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 (800 ng, 400 ng, 200 ng, 100 ng e 50 ng) utilizando como valor fixo do Fab CR3022, purificado dos clones E2 e G9, a menor quantidade de anticorpo usada no ensaio preliminar (500 ng). A partir do teste de One Way ANOVA foi verificado que 100 ng é a menor quantidade comum dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 que apresenta diferença significativa de

absorbância com relação ao controle negativo, para  $\alpha$  igual a 0,05 (Figura 31B). Esta foi então a concentração de antígenos definida para imobilização na placa para titulação do Fab CR3022 purificado dos clones E2 e G9. O Fab das duas preparações foi testado em cinco concentrações distintas de 500 ng, 400 ng, 200 ng, 100 ng e 50 ng. Em teste de One Way ANOVA verificamos que 100 ng é a quantidade mínima do Fab CR3022 capaz de se ligar a ambos os RBDs e que apresenta diferença significativa do controle negativo para  $\alpha$  igual a 0,05 (Figura 31C).

Ensaios de ELISA têm sido utilizados para demonstrar interação do RBD de SARS-CoV-2 recombinante com soro de pacientes da COVID-19 ou para testar interação de anticorpos recombinantes. StadIbauer et al. (2020) ao estabelecerem protocolo para teste sorológico utilizaram 100 ng de RBD de SARS-CoV-2 recombinante, produzido em células HEK293F. Chi et al. (2020) realizaram ensaio de ELISA para verificar sobreposição de epítopos entre diferentes anticorpos monoclonais, utilizando CR3022 como controle positivo. Yuan et al. (2020) em teste de captura do IgG de CR3022 com RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, também imobilizaram 100 ng dos antígenos, mas utilizaram 20 µg do anticorpo.

Nossos resultados mostram que o Fab recombinante interage com os dois antígenos recombinantes, indicando que todas as moléculas são funcionais. A análise por teste t, realizada a partir dos dados do ensaio de ELISA com 100 ng dos antígenos e 100 ng do anticorpo, mostrou que há diferença significativa de interação do Fab com os RBDs, para α igual a 0,05 (valor de p igual a 0,0026 para clone E2 e 0,0097 para G9). Consistente com os dados de afinidade obtidos por meio de ensaio de ligação de interferometria por Yuan et al. (2020), os clones E2 e G9 apresentaram maior afinidade por RBD de SARS-CoV-1 do que por RBD de SARS-CoV-2 (Figura 32).



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A análise do ensaio preliminar de ELISA com 850 ng de RBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 imobilizados e 0,5, 1 e 2 µg do clone E2 do Fab CR3022. Em B dados do ensaio de ELISA para titulação dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 com 0,5 µg dos do Fab CR3022 purificado dos clones E2 e G9, analisados pelo teste de One Way ANOVA. Em C dados do ensaio de ELISA para titulação do Fab CR3022 com 100 ng dos RBDs imobilizados analisados pelo teste de One Way ANOVA. Asteriscos representam nível de significância; ns: não significativo. Análises realizadas por meio do programa GraphPad.

# FIGURA 32 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO DIFERENCIAL DO Fab CR3022 COM O RBD DE SARS-CoV-1 E SARS-CoV-2



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Asteriscos representam nível de significância, p=0,0026 para E2 e p=0,0097 para G9. Análise realizadas por meio do programa GraphPad.

# 4.3 CONSTRUÇÃO DE NOVO VETOR pDEHA PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS

4.3.1 Novo vetor pDEHA\_v1

A transfecção de um único vetor para co-expressão de cadeias polipeptídicas tem se mostrado vantajosa por garantir a entrega de ambas as cadeias para a célula transfectada. O vetor pcDNAmod-eGFP, otimizado neste trabalho, possibilitou a co-expressão de cadeias e se mostrou eficiente para produção de anticorpos diméricos, bem como para seleção de clones a partir da fluorescência emitida pela proteína repórter. Porém, a integração genômica do DNA transfectado ocorre de forma aleatória, podendo ser um evento improdutivo se ocorrer em região não ativa transcricionalmente.

Nesse sentido, um novo vetor para co-expressão de proteínas diméricas, pDEHA, foi construído pensando na integração genômica direcionada do DNA para inserção no locus AAVS1, e para redução da variação de expressão entre os clones. Além disso, planejamos a inserção de sítios apropriados para subclonagem sequencial de duas cadeias, visando diminuir o número de etapas comparado ao pcDNAmod-eGFP. Elementos regulatórios, íntron e WPRE, que tendem a melhorar o nível de expressão também foram adicionados, além da inserção de uma proteína

repórter, LSSmKate2 (Piatkevich et al., 2010), para acompanhamento da transfecção, e de etiquetas, deca-histidina e c-Myc, para auxílio na purificação e na detecção da proteína recombinante.

Durante a construção do vetor pDEHA\_v1 todas as subclonagens realizadas foram confirmadas por digestões enzimáticas analisadas em gel de agarose, bem como a amplificação do fragmento Amp-Ori, confirmando a obtenção de fragmentos nos tamanhos esperados. A inserção de fragmentos em vetores linearizados com apenas uma enzima de restrição, também tiveram sua orientação confirmada por sequenciamento. A confirmação da construção do vetor pDEHA\_v1, realizada por digestão com enzimas de restrição, está demonstrada na figura 33A e o esquema do vetor pode ser visualizado na figura 33B.

#### FIGURA 33 - VETOR DE EXPRESSÃO pDEHA\_v1



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A eletroforese em gel de agarose 0,8% com o vetor circular (VC) pDEHA\_v1 e as digestões confirmatórias com as enzimas *Hin*dIII e *Nh*el (1 – 3517 pb e 5835 pb), *Bg/*II e *Pvu*I (2 - 4061 pb e 5291 pb) e *Af*/II, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Sal*I e *Xh*ol (3 – 961 pb, 1502 pb, 1723 pb, 2470 pb e 2696 pb). Em B esquema do vetor pDEHA\_v1 construído utilizando o programa SnapGene (GLS Biotech), com destaque dos sítios de clivagem das enzimas *Bg*/II e *Eco*RI e *Hin*dIII e *Not*I disponíveis para inserção das cadeias pesada e leve, respectivamente. M: marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Para verificar a eficácia do vetor pDEHA\_v1 para expressão de proteínas diméricas, as cadeias pesada e leve do Fab CR3022 foram subclonadas nos sítios *Bg/*II e *Eco*RI e, *Hind*III e *Not*I, respectivamente, sendo que, anteriormente, a cadeia pesada recebeu a adição do sítio *Bg/*II na extremidade 3' através de uma amplificação por PCR utilizando um oligonucleotídeo iniciador contendo este sítio de restrição (Figura 34A). A montagem do vetor pDEHA\_v1-CR3022HL foi confirmada por digestão enzimática (Figura 34B e 34C).

Para transfecção, o vetor pDEHA\_v1-CR3022HL foi digerido com as enzimas *Age*l e *Sal*l, resultando no vetor linear (9107 pb) com cada braço de homologia em uma extremidade (Figura 34D). A transfecção foi realizada em paralelo com a transfecção do vetor pcDNAmod-eGFP-CR3022HL (seção 4.2.2), em garrafa de 75 cm<sup>2</sup>.





FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A eletroforese em gel de agarose 1% com o produto CR3022H contendo sítio 3' para *Bg/*II obtido por PCR (795 pb) (A). Em B e C eletroforese em gel de agarose 0,8% com vetor circular (VC) pDEHA\_v1-CR3022H e a digestão confirmatória com as enzimas *Eco*RI e *Bg/*II (1 –9339 pb e 783 pb) (B); com vetor circular pDEHA\_v1-CR3022HL e a digestão *Hin*dIII e *Not*I (1 – 10109 pb e 856 pb) (C). Em D eletroforese em gel de agarose 0,8% com os vetores lineares para transfecção, pcDNAmod-eGFP-CR3022HL 8026 pb e fragmento liberado 1008 pb (1) e pDEHA\_v1-CR3022HL 9107 pb e fragmento liberado Amp-Ori 1858pb (2). M: marcador de massa molecular 1 *Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). M2: marcador de massa *Precision Molecular Mass Ruler* (Bio-Rad).

Em análise por microscopia de fluorescência não foi possível detectar células fluorescentes. Em Western blot utilizando o sobrenadante purificado em resina de níquel (Figura 35B) foi visualizada presença das cadeias pesada e leve, no entanto a população SA e a população submetida ao enriquecimento (população E) não sobreviveram à seleção com G418. Duas transfecções subsequentes foram realizadas em placa de 6 poços, submetendo a cultura à seleção com G418 no quarto dia, todavia não foi obtido sucesso. Como controle foi transfectado o vetor pcDNAmod-eGFP-CR3022HL, que apresentou células selecionadas em ambas as transfecções.

Com base nos dados de literatura conferidos, não foi possível encontrar uma explicação para não inserção genômica do cassete de recombinação homóloga, por conseguinte uma nova construção (pDEHA\_v2) com algumas modificações foi então realizada.

#### FIGURA 35 – EXPRESSÃO DO Fab CR3022 NO QUARTO DIA APÓS TRANSFECÇÃO COM pDEHA\_v1-CR3022HL



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A e B purificação do sobrenadante da cultura celular após quatro dias da transfecção com pDEHA\_v1-CR3022HL analisada por SDS-PAGE (A) e por Western blot (B). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) não corado em (A) e précorado em (B); L: lavagem; E1, E2, E3 e E4: eluições com imidazol; R: resina. Setas indicam cadeia pesada fusionada com LSSmKate2 (CH-LSSmKate2) e cadeia leve (CL).

# 4.3.2 Novo vetor pDEHA\_v2

Visando diminuir o tamanho do cassete de recombinação, o elemento WPRE foi retirado do vetor. Embora haja relatos de que o elemento pós-transcricional contribuiu com elevados rendimentos na expressão em células de mamíferos (Backliwal et al., 2008; Callendret et al., 2007), os efeitos do WPRE podem variar de acordo com o promotor, transgene e tipo celular (Zanta-Boussif et al., 2009). O WPRE foi removido da sequência já modificada CasseteL-CMV-íntron-WPRE utilizada para construção do pDEHA\_v1 (etapa 4 do item 3.2.4.1) e sua retirada foi confirmada por digestão enzimática (Figura 36A).

Outra modificação realizada foi a inserção do fragmento IRES2-eGFP em substituição a LSSmKate2, para inserir uma proteína com fluorescência mais intensa expressa a partir de iniciação interna da tradução, visto que o acompanhamento da transfecção é facilitado quando eGFP se encontra no interior de célula (observada na transfecção dos RBDs com pIRES2-eGFP), não sendo detectada por microscopia de fluorescência no período pré-seleção com antibiótico G418 quando secretada junto com CH (como verificado na transfecção do Fab CR3022 com pcDNAmod-eGFP).

O fragmento IRES2-eGFP, obtido por PCR de Fusão (Figura 36B), foi inserido no local onde se encontrava LSSmKate2 na sequência do CasseteH (pUC57-

CasseteH) adquirida comercialmente e teve confirmação por digestão enzimática (Figura 36C). Após subclonagem do CasseteL-CMV-íntron sem WPRE no pUC57-CasseteH-IRES2-eGFP (Figura 36D), os cassetes foram subclonados no vetor intermediário pAmpOri-HA-Neo (Figura 36E), resultando no vetor final pDEHA\_v2 (Figura 36F). A seguir foram subclonadas as cadeias pesada e leve e, após confirmação (Figura 36G), o vetor foi digerido com as enzimas *Age*I e *Sal*I, resultando no vetor linear de 8568 pb (Figura 36H) com cada braço de homologia em uma extremidade. A transfecção foi realizada em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.

No quarto dia após a transfecção foi adicionado G418 às culturas, no entanto, apesar das modificações realizadas no vetor pDEHA\_v2, não obtivemos êxito no processo de seleção dos transfectantes. O controle positivo pcDNAmod-eGFP-CR3022HL, transfectado em paralelo, foi selecionado com G418, enquanto a população transfectada com pDEHA\_v2 não sobreviveu à seleção.



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A confirmação da retirada do WPRE do vetor CasseteL-CMV-íntron-WPRE por digestão com *Xba*l (1- 4472 pb) e *Nco*l e *Xba*l (2- 871 pb e 3050 pb). Em B fragmento IRES2-eGFP (1386 pb) obtido por PCR de fusão. Em C confirmação da substituição de LSSmKate2 por IRES2-eGFP com *Kpn*l (1 – 1156 pb e 4053 pb) e *Bg*/II e *Bam*HI (2 – 1374 pb e 3805 pb). Em D confirmação da subclonagem do CasseteL-CMV-íntron sem WPRE no pUC57-CasseteH-IRES2-eGFP com *Spe*l (1 – 6401pb) e *Nde*I (2 – 1240 pb, 2480 pb e 2681 pb). Em E confirmação da subclonagem do CasseteHL em AmpOri-HA-Neo com *Nhe*I e *Hind*III (1 – 3529 pb e 5284 pb). Em F esquema do novo vetor pDEHA\_v2 construído utilizando o programa SnapGene (GLS Biotech), com destaque dos sítios de clivagem das enzimas *Bg*/II e *Eco*RI e, *Hind*III e *Not*I disponíveis para inserção das cadeias pesada e leve, respectivamente. Em G confirmação da subclonagem da cadeia pesada e leve com *Bg*/II e *Eco*RI (1- 783 pb e 8800 pb) e com *Hin*dIII e *Nh*eI (2 – 4299 pb e 5284 pb). Em H linearização dos vetores para transfecção, pDEHA\_v2 vazio 6955 pb e fragmento liberado Amp-Ori 1858 pb (1) e pDEHA\_v2-CR3022HL 8568 pb e fragmento liberado 1858 pb (2). Em A, B, C, D, E, G e H eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador de massa molecular *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). M2: marcador de massa *Precision Molecular Mass Ruler* (Bio-Rad). VC: vetor circular. Através do alinhamento da sequência codificadora da aminoglicosídeo 3'fosfotransferase, que confere resistência à G418, identificamos uma substituição de bases (adenina por timina) na posição 563, realizada erroneamente para exclusão do sítio da enzima de restrição *Ncol*, durante o desenho das sequências para construção do novo vetor pDEHA. Esta troca acarretou na substituição de um resíduo de histidina por uma leucina na posição 188, próximo ao sítio ativo da enzima que corresponde ao resíduo Asp190 (Figura 37), de acordo com a base da dados UniProt (https://www.uniprot.org/). Nota-se na estrutura cristalográfica da enzima (PDB 1ND4) que o resíduo de histidina está presente em um bolsão, fazendo três ligações polares que auxiliam na estabilização da estrutura. Embora leucina seja um aminoácido hidrofóbico, podendo se enterrar nesse bolsão, as mesmas interações não ocorreriam, ocasionando perda da estrutura original.

FIGURA 37 – ANÁLISE DA ESTRUTURA DA AMINOGLICOSÍDEO 3'-FOSFOTRANSFERASE MOSTRANDO A TROCA DE RESÍDUO H188L



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Representação da estrutura cristográfica da enzima de resistência G418 (*cartoon* ciano) com ampliação focada nos resíduos Asp190 (*stick* laranja) e His188 (*stick* rosa); à direita demonstração da substituição de His188 por Leu188 (*stick* roxo) presente na sequência codificadora da aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase contida no vetor pDEHA\_v2. Imagem obtida por intermédio do programa PyMOL a partir da estrutura 1ND4 depositada no banco de dados PDB, Protein Data Bank.

### 4.3.3 Novo vetor pDEHA\_v3

Visto que a troca de base verificada na sequência codificadora da aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase, que ocasiona substituição de aminoácido, pode ser a causa da ausência de atividade da enzima e consequente morte das células transfectadas na seleção com G418, realizamos a substituição dessa sequência por uma correta.

A sequência do cassete NeoR correta foi amplificada por PCR a partir do vetor pcDNAmod-eGFP, utilizado com êxito para expressão do Fab CR3022, e inserida nopDEHA\_v2, vetor que já possuía IRES2-eGFP. A inserção da sequência correta foi confirmada pela digestão com a enzima *Xho*I (Figura 38A), uma vez que o cassete NeoR contendo a sequência codificadora da aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase com erro possui sítio para esta enzima e o cassete com a sequência correta não possui. A sequência nucleotídica do inserto foi confirmada também por sequenciamento de DNA. Para transfecção, o vetor pDEHA\_v3-CR3022HL (Figura 38B) foi digerido com as enzimas *Age*I e *Sal*I (Figura 38C), para resultar no vetor linear com cada braço de homologia em uma extremidade e a transfecção foi realizada em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup>.



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A eletroforese em gel de agarose 0,8% com confirmação da substituição do cassete NeoR contendo a sequência codificadora da aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase com erro (versão 2) pelo NeoR com sequência correta (versão 3) com *Xbal* e *AflII* (1 – 8914 pb e 1515 pb; 5 – 8914 pb e 1512 pb), *Xbal* e *Bg/II* (2 – 6717 pb e 3712 pb; 6 – 6714 pb e 3712), *Xhol* e *AflII* (3 - 10429 pb e 7 – 8924 pb e 1502 pb) e *Xhol* e *Bg/II* (4 - 10429 pb e 8 – 6704 pb e 3722 pb). Em B esquema do novo vetor pDEHA-CR3022HL construído utilizando o programa SnapGene (GLS Biotech), com destaque para os sítios das enzimas *Agel* e *Sa/I* usados para linearização do vetor. Em C eletroforese em gel de agarose 0,8% com linearização do novo vetor pDEHA-CR3022HL para transfecção utilizando *Agel* e *Sa/I* (1 – 8571 pb e 1858 pb). M: marcador de massa molecular 1 *Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen). M2: marcador de massa *Precision Molecular Mass Ruler* (Bio-Rad).

Na análise por citometria de fluxo realizada com as células no quarto dia após a transfecção, antes da seleção com G418, foi contabilizado cerca de 10% de células GFP positivas (Figura 39A). Em Western blot realizado a partir da purificação do sobrenadante da cultura, foi verificada a presença das bandas referentes à CH e à CL na fração eluída com imidazol (E, Figura 39C), confirmando a expressão do Fab CR3022. A CH, diferente da construção pcDNAmod-eGFP, não está em fusão com eGFP, de forma que as duas cadeias do Fab migram em posição próxima em géis de SDS-PAGE.

FIGURA 39 – ANÁLISE DA TRANSFECÇÃO COM pDEHA\_v3-CR3022HL E DA EXPRESSÃO DAS DUAS CADEIAS DO Fab CR3022



FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A gráficos gerados a partir da contagem de células eGFP positivas no equipamento CytoFLEX LX (Backman Coulter) no quarto dia após transfecção com pDEHA\_v3-CR3022HL e contagem na cultura controle – células não transfectadas. PI: lodeto de propídeo. Em B e C purificação do Fab CR3022 a partir do sobrenadante da cultura celular no quarto dia após transfecção com pDEHA\_v3-CR3022HL analisada por SDS-PAGE (B) e por Western blot (C). Setas indicam cadeia pesada (CH) na eluição com imidazol (E), cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) no controle positivo (CP – sobrenadante de cultura Fab CR3022 clone E2) e cadeia leve (CL) na eluição com imidazol (E) e no controle positivo (CP). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) não corado em (B) e pré corado em (C); PC: pré-coluna; NL: não ligado; L: lavagem; E: eluição com imidazol; R: resina; CN: controle negativo – eluição com imidazol da purificação do sobrenadante de cultura de células não transfectadas.

Com essa versão 3 do novo vetor nós obtivemos êxito na seleção dos transfectantes com G418, confirmando que a versão da enzima aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase não estava ativa nas versões anteriores do vetor (pDEHA\_v1 e pDEHA\_v2). E, por conseguinte, provavelmente o tamanho do vetor pDEHA\_v1 com WPRE não tenha sido um impeditivo para a transfecção.

A cultura transfectada selecionada com G418 foi expandida para garrafa de 75 cm<sup>2</sup> (Figura 40A) e submetida à análise por citometria de fluxo, verificando aumento na porcentagem de células GFP positivas para 18,4% (Figura 40B). Em Western blot, realizado a partir da purificação do sobrenadante da cultura, confirmamos a expressão das duas cadeias do Fab CR3022 (Figura 40D).



FIGURA 40 – ANÁLISE DA TRANSFECÇÃO COM pDEHA\_v3-CR3022HL APÓS SELEÇÃO COM G418 E DA EXPRESSÃO DAS DUAS CADEIAS DO Fab CR3022

FONTE: O autor (2022). LEGENDA: Em A análise da fluorescência de eGFP no microscópio LEICA DMi8, à direita imagem no campo claro e a esquerda imagem da fluorescência. Em B gráficos gerados a partir da contagem de células eGFP positivas no equipamento CytoFLEX LX (Backman Coulter) após seleção com G418 da cultura transfectada com pDEHA\_v3-CR3022HL e contagem na cultura controle – células não transfectadas. PI: lodeto de propídeo. Em C e D purificação do Fab CR3022 a partir sobrenadante da cultura celular proveniente da transfecção com pDEHA\_v3-CR3022HL, após seleção com G418, analisada por SDS-PAGE (C) e por Western blot (D). Setas indicam cadeia pesada (CH) na eluição com imidazol (E), cadeia pesada fusionada com eGFP (CH-eGFP) no controle positivo (CP – sobrenadante de cultura Fab CR3022 clone E2) e cadeia leve (CL) na eluição com imidazol (E) e no controle positivo (CP). M: marcador de massa molecular *Precision Plus Protein* (BioRad) não corado em (C) e pré corado em (D); PC: pré-coluna; NL: não ligado; L: lavagem; E: eluição com imidazol; R: resina; CN: controle negativo – eluição com imidazol da purificação do sobrenadante de cultura de células não transfectadas.

Em conjunto, nossos resultados mostram que o novo vetor denominado pDEHA é funcional, permitindo a co-expressão de proteínas diméricas. O vetor pDEHA reduz o número de passos de clonagem necessários para inserção de cadeias diméricas, comparado ao vetor pcDNAmod-eGFP, diminuindo tempo de trabalho e a manipulação do DNA. O vetor pDEHA também já possui a etiqueta deca-histidina e Myc, para purificação por afinidade à níquel e para detecção dos monômeros de proteínas diméricas, dispensando a síntese comercial de etiquetas nas regiões codificantes. Além disso a presença de IRES2-eGFP no cassete de expressão permite o acúmulo da expressão do gene repórter no interior da célula, possibilitando o acompanhamento da transfecção por meio da fluorescência.

O íntron A do CMV foi inserido no vetor pDEHA para promover elevada expressão gênica, uma vez que em organismos eucariotos a presença de íntron influencia as etapas de transcrição, poliadenilação, exportação do RNA mensageiro e da eficiência de tradução. Nott et al. (2003), ao estudar a influência de íntron sobre a expressão do gene exógeno luciferase em células HeLa, verificaram que, mesmo com a transcrição sendo impulsionada pelo promotor CMV, a presença de um íntron na posição 5' elevou significativamente a expressão gênica, devido ao aumento do acúmulo de RNA mensageiro 13 vezes maior que o nível do controle. Xia et al. (2006) demonstraram que o cassete de expressão contendo o promotor CMV na presença do íntron A eleva os níveis de expressão de proteínas recombinantes em células 293EBNA, tanto em transfecções transiente quando em linhagens estáveis.

O locus AAVS1, selecionado para integração direcionada do vetor pDEHA, foi validado como porto seguro genômico por Yang et al. (2019) em HEK293T e por Shin et al. (2020) em HEK293E, e ao ser comparado com CCR5 e ROSA26, o uso do AAVS1 apresentou maior expressão proteica e maior homogeneidade. Além disso, o uso do promotor CMV se mostrou mais favorável em comparação a EF1α e SV40 (Shin et al., 2020). Conforme estratégia realizada por Shin et al. (2020), os braços de homologia que franqueiam o cassete de recombinação do vetor pDEHA servem como molde de reparo da quebra da dupla fita de DNA no locus gênico AAVS1 promovida por edição sítio específica via metodologia CRISPR/Cas9.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os vetores pIRES2-eGFP e pcDNAmod-eGFP, utilizados respectivamente para expressão dos RBDs de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 e do Fab do anticorpo CR3022, em conjunto com as metodologias de transfecção e seleção clonal utilizadas, se mostraram eficientes para geração de linhagens com expressão proteica estável, mesmo a partir de integração genômica não direcionada.

O vetor pcDNAmod-eGFP otimizado possibilita a triagem de clones com elevada expressão da cadeia pesada do anticorpo e, consequentemente, triagem inicial de clones com maior produtividade proteica. No entanto a integração não direcionada do DNA transfectado pode gerar variação no nível de expressão das cadeias pesada e leve entre os clones. Neste sentido o novo vetor pDEHA construído se mostra promissor para geração de linhagem celular com baixa variação entre os clones e alta produtividade de proteínas diméricas.

Ante os resultados expostos, as ferramentas e metodologias estabelecidas apresentam valor significativo para produção laboratorial de insumos que possam auxiliar no desenvolvimento de testes de diagnóstico da COVID-19, bem como auxiliar em pesquisas diversas.

## 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados e conclusões deste trabalho possibilitam estabelecer as seguintes recomendações para trabalhos futuros:

 Para a análise do número de eventos de inserção genômica dos clones gerados pela transfecção com pcDNAmod-eGFP testar novos oligonucleotídeos iniciadores para CH, CL e GAPDH, além de testar outros normalizadores endógenos;

- Com relação ao novo vetor pDEHA verificar o local de inserção genômica nas células HEK293 transfectadas; isolar clones e verificar o nível de expressão proteica; testar a inserção direcionada utilizando sistema CRISPR/Cas9; e analisar a funcionalidade do Fab expresso por ensaio de ELISA. A reintegração do WPRE no vetor também pode ser realizada para verificar se o elemento promove aumento do nível de expressão.

# REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Tradução de: ROBAINA, T. F. et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 8. Ed., 2015.

AHN, D. G.; SHIN, H. J.; KIM, M. H.; et al. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 313–324, 2020.

AMANAT, F.; STADLBAUER, D.; STROHMEIER, S.; et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1033–1036, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5">http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5</a>>.

ASSELAH, T.; DURANTEL, D.; PASMANT, E.; LAU, G.; SCHINAZI, R. F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168–184, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.031">https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.031</a>>.

ASSUR, Z.; SCHIEREN, I.; HENDRICKSON, W. A.; MANCIA, F. Two-color selection for amplified co-production of proteins in mammalian cells. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 319–324, 2007.

BACKLIWAL, G.; HILDINGER, M.; CHENUET, S.; et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 15, 2008.

BALDI, L.; HACKER, D. L.; ADAM, M.; WURM, F. M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 677–684, 2007.

BARNES, C. O.; WEST, A. P.; HUEY-TUBMAN, K. E.; 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, p. 828- 842.e16, 2020.

BERROW, N. S.; ALDERTON, D.; SAINSBURY, S.; et al. A versatile ligationindependent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 6, 2007.

BHOSKAR, P.; BELONGIA, B.; SMITH, R.; et al. Free light chain content in culture media reflects recombinant monoclonal antibody productivity and quality. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1131–1139, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19.** Disponível em: <a href="https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos">https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos</a>>. Acesso em 14 agosto 2022a. BRASIL. Ministério da Saúde. **Painel Coronavírus.** Disponível em: <a href="https://covid.saude.gov.br/">https://covid.saude.gov.br/</a>. Acesso em 13 outubro 2022b.

CALLENDRET, B.; LORIN, V.; CHARNEAU, P.; et al. Heterologous viral RNA export elements improve expression of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein and protective efficacy of DNA vaccines against SARS. **Virology**, v. 363, n. 2, p. 288–302, 2007.

CANIELS, T. G.; BONTJER, I.; VAN DER STRATEN, K.; et al. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern evade humoral immune responses from infection and vaccination. **Science Advances**, v. 7, n. 36, 2021.

CASTRO, R.; NOBRE, L. S.; ELEUTÉRIO, R. P.; et al. Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: Impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 6, p. 2202–2219, 2021.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Science Brief: Omicron (B.1.1.529) Variant**. Disponível em: <a href="https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-briefomicron-variant.html">https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-briefomicron-variant.html</a>. Acesso em: 13 janeiro 2022.

CHAN, J.; SHUOFENG, Y.; KIN-HANG; et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, p. 514–523, 2020.

CHI, X.; YAN, R.; ZHANG, JUN; et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 650–655, 2020.

CORMAN, V.; LANDT, O.; KAISER, M.; et al. Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. **Euro Surveill**, v. 25, n. 3, p. 1–8, 2020.

COUTARD, B.; VALLE, C.; LAMBALLERIE, X.; et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade.pdf. **Antiviral Research**, v. 176, p. 1–5, 2020.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. **Circ Res**, v. 87, p. 1–9, 2000.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1110–1122, 2016.

FDA – Food and Drug Administration. **Coronavirus (COVID-19) I Drug**. Disponível em:<https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>. Acesso em 14 agosto 2022.

FEIGE, M. J.; GROSCURTH, S.; MARCINOWSKI, M.; et al. An Unfolded CH1 Domain Controls the Assembly and Secretion of IgG Antibodies. **Molecular Cell**, v. 34, n. 5, p. 569–579, 2009. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.028>.

FEIGE, M. J.; HENDERSHOT, L. M.; BUCHNER, J. How antibodies fold. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 189–198, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.005">http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2009.11.005</a>>.

GHADERI, D.; ZHANG, M.; HURTADO-ZIOLA, N.; VARKI, A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 28, p. 147–176, 2012.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S.; MUNIVEERAPPA, V. B.; BALAMURUGAN, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 346–356, 2016.

GUO, Y. R.; CAO, Q. D.; HONG, Z. S.; et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2020. Military Medical Research.

HACKER, D. L.; WURM, F. M. Recombinant DNA Technology for Production of **Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells** ★. Elsevier Ltd., 2017.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.

HAWLEY-NELSON, P.; CICCARONE, V.; MOORE, M. L. Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. **Current Protocols in Molecular Biology**, , n. SUPPL. 81, p. 1–17, 2008.

HIRASHIMA, M.; IMAMURA, T.; YANO, K.; et al. High-level expression and preparation of recombinant human fibrinogen as biopharmaceuticals. **Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 261–270, 2016.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 779- 784.e5, 2020.

HUSSAIN, H.; PATEL, T.; OZANNE, A. M. S.; et al. A comparative analysis of recombinant Fab and full-length antibody production in Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 12, p. 4815–4828, 2021.

JIANG, S.; DU, L.; SHI, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 275–277, 2020.
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, 2020. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.007">https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.007</a>>.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; SHARFSTEIN, S. T. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells: A comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 313–318, 2006.

KAUFMAN, W. L.; KOCMAN, I.; AGRAWAL, V.; et al. Homogeneity and persistence of transgene expression by omitting antibiotic selection in cell line isolation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 17, 2008.

KIM, Y. G.; PARK, B.; AHN, J. O.; et al. New cell line development for antibodyproducing Chinese hamster ovary cells using split green fluorescent protein. **BMC Biotechnology**, v. 12, 2012.

KRIZ, A.; SCHMID, K.; BAUMGARTNER, N.; et al. A plasmid-based multigene expression system for mammalian cells. **Nature Communications**, v. 1, n. 8, 2010.

LAN, J.; GE, J.; YU, J.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5">http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5</a>>.

LEE, C. J.; SETH, G.; TSUKUDA, J.; HAMILTON, R. W. A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1107–1118, 2009.

LI RUIYUN; PEI SEN; CHEN BIN; et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV2). **Science**, v. 368, p. 489–493, 2020. Disponível em: <a href="http://science.sciencemag.org/">http://science.sciencemag.org/</a>.

LIU, C.; DALBY, B.; CHEN, W.; KILZER, J. M.; CHIOU, H. C. Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. **Molecular Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 141–153, 2008.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, p. 565–574, 2020.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; 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, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736">http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736</a>(20)30251-8>.

MAGISTRELLI, G.; POITEVIN, Y.; SCHLOSSER, F.; et al. Optimizing assembly and production of native bispecific antibodies by codon de-optimization. **mAbs**, v. 9, n. 2, p. 231–239, 2017. Taylor & Francis. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2016.1267088">http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2016.1267088</a>>.

MALM, M.; SAGHALEYNI, R.; LUNDQVIST, M.; et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Nature Publishing Group UK. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8">https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8</a>>.

MARDIAN, Y.; KOSASIH, H.; KARYANA, M.; NEAL, A.; LAU, C. Y. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 615099, p. 1–24, 2021.

MEHALKO, J.; DREW, M.; SNEAD, K.; et al. Improved production of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) for serology assays. **Protein Expression and Purification**, v. 179, n. November 2020, p. 105802, 2021. Elsevier Inc. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105802">https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105802</a>>.

TER MEULEN, J.; VAN DEN BRINK, E. N.; POON, L. L. M.; et al. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: Synergy and coverage of escape mutants. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1071–1079, 2006.

MUNSTER, V. J.; KOOPMANS, M.; VAN DOREMALEN, N.; VAN RIEL, D.; DE WIT, E. A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 692–694, 2020.

NADERI, F.; HASHEMI, M.; BAYAT, H.; et al. The Augmenting Effects of the tDNA Insulator on Stable Expression of Monoclonal Antibody in Chinese Hamster Ovary Cells. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 37, n. 5, p. 200–206, 2018.

NOTT, A.; MEISLIN, S. H.; MOORE, M. J. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. **Rna**, v. 9, n. 5, p. 607–617, 2003.

OU, X.; LIU, Y.; LEI, X.; et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1620, p. 1–12, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9">http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9</a>>.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT– PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2003–2007, 2001.

PIATKEVICH, K. D.; HULIT, J.; SUBACH, O. M.; et al. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 12, p. 5369–5374, 2010.

PINTO, D.; PARK, Y. J.; BELTRAMELLO, M.; et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 290–295, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y">http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y</a>>.

PRABAKARAN, P.; GAN, J.; FENG, Y.; et al. Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor-binding domain complexed with neutralizing antibody. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15829–15836, 2006.

PREMKUMAR, L.; SEGOVIA-CHUMBEZ, B.; JADI, R.; et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science Immunology**, v. 5, n. 48, p. 1–10, 2020.

PRONOBIS, M. I.; DEUITCH, N. e PEIFER, M. The Miraprep: A protocol that uses a Miniprep Kit and provides Maxiprep yields. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

RENAUD-GABARDOS, E.; HANTELYS, F.; MORFOISSE, F.; et al. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 11–20, 2015.

RITCHIE, H; MATHIEU, E; RODÉS-GUIRAO, I; et al. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Publicado online em **OurWorldInData**. Disponível em:<https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>. Acesso em 13 outubro 2022.

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

SADELAIN, M.; PAPAPETROU, E. P.; BUSHMAN, F. D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 51–58, 2012.

SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Ed., 2001.

SANTOS, N. F. B. Desenvolvimento de novos vetores para expressão de anticorpos e proteínas oligoméricas. **Instituto Carlos Chagas** – ICC/FIOCRUZ-PR, 2016. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Curitiba, 2016.

SCHLATTER, S.; STANSFIELD, S. H.; DINNIS, D. M.; et al. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 122–133, 2005.

SHAJAHAN, A.; SUPEKAR, N. T.; GLEINICH, A. S.; AZADI, P. Deducing the N- And O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. **Glycobiology**, v. 30, n. 12, p. 981–988, 2020.

SHANG, J.; YE, G.; SHI, K.; et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y"></a>.

SHI, Y.; WANG, G.; CAI, X.; et al. An overview of COVID-19. **Zhejiang Univ-Sci B** (Biomed & Biotechnol), v. 1581, p. 1–18, 2020.

SHIN, S.; KIM, S. H.; SHIN, S. W.; et al. Comprehensive Analysis of Genomic Safe Harbors as Target Sites for Stable Expression of the Heterologous Gene in HEK293 Cells. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 6, p. 1263–1269, 2020.

SIMABUCO, F. M.; MORELLO, L. G.; ARAGÃO, A. Z. B.; LEME, A. F. P.; ZANCHIN, N. I. T. Proteomic characterization of the human FTSJ3 preribosomal complexes. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 6, p. 3112–3126, 2012.

SINEGUBOVA, M. V.; ORLOVA, N. A.; KOVNIR, S. V.; DAYANOVA, L. K.; VOROBIEV, I. I. High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320-537 in stably transfected CHO cells by the EEF1A1-based plasmid vector. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2 February, p. 1–19, 2021. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0242890">http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0242890</a>>.

STADLBAUER, D.; AMANAT, F.; CHROMIKOVA, V.; et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. **Current Protocols in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 1– 15, 2020.

TAN, E.; SZE, C.; CHIN, H.; et al. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 9, n. 796991, p. 1–9, 2021. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

TEE, K. L.; JACKSON, P. J.; SCARROTT, J. M.; et al. Purification of recombinant SARS-CoV-2 spike, its receptor binding domain, and CR3022 mAb for serological assay. **bioRxiv**, p. 2020.07.31.231282, 2020.

THYE, A. Y. K.; LAW, J. W. F.; PUSPARAJAH, P.; et al. Emerging sars-cov-2 variants of concern (Vocs): An impending global crisis. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1–25, 2021.

TORTORICI, M. A.; VEESLER, D. **Structural insights into coronavirus entry**. 1° ed. Elsevier Inc., 2019.

WALLS, A. C.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292.e6, 2020. Elsevier. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058">http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058</a>>.

WALLS, A. C.; XIONG, X.; PARK, Y.-J.; et al. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. **Cell**, v. 183, n. 6, p. 1732, 2019.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020.

WANG, Q.; ZHANG, Y.; WU, L.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894-904.e9, 2020.

WHO – World Health Organization. **Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** Disponível em: <a href="https://covid19.who.int/">https://covid19.who.int/</a>>. Acesso em 13 outubro 2022a. WHO – World Health Organization. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <a href="https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/">https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/</a>>. Acesso em: 13 janeiro 2022b.

WHO – World Health Organization. **Weekly epidemiological update on COVID-19 -10 August 2022**. Disponível em: < https://www.who.int/publications/m/item/weeklyepidemiological-update-on-covid-19---12-october-2022>. Acesso em 13 outubro 2022c.

WRAPP, D.; WANG, N.; CORBETT, K. S.; et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

WROBEL, A. G.; BENTON, D. J.; HUSSAIN, S.; et al. Antibody-mediated disruption of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19146-5">http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19146-5</a>>.

WU, D.; WU, T.; LIU, Q.; YANG, Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44–48, 2020.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.

WU, N. C.; YUAN, M.; BANGARU, S.; et al. A natural mutation between SARS-CoV-2 and SARS-CoV determines neutralization by a cross-reactive antibody. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. 1–18, 2020. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009089">http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009089</a>>.

WU, Y.; WANG, F.; SHEN, C.; 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, 2020.

XIA, W.; BRINGMANN, P.; MCCLARY, J.; et al. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 1, p. 115–124, 2006.

YANG, H.; WANG, J.; ZHAO, M.; et al. Feasible development of stable HEK293 clones by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration for biopharmaceuticals production. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 8–9, p. 941–950, 2019. Springer Netherlands. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1007/s10529-019-02702-5">https://doi.org/10.1007/s10529-019-02702-5</a>.

YANG, Y.; ZHANG, P.; ZHONG, W.; et al. Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 By Full-Length Human ACE2. **Science**, v. 367, p. 1444–1448, 2020. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008">https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008</a>>.

YAO, H.; SONG, Y.; YAO, H.; et al. Article Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus II II Article Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. **Cell**, v. 183, n. 3, p. 730- 738.e13, 2020. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018">https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018</a>>. YUAN, M.; WU, N. C.; ZHU, X.; 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, 2020.

ZANTA-BOUSSIF, M. A.; CHARRIER, S.; BRICE-OUZET, A.; et al. Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: Application to the gene therapy of WAS. **Gene Therapy**, v. 16, n. 5, p. 605–619, 2009.

ZHOU, P.; YANG, X. LOU; WANG, X. G.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. Springer US. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7">http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7</a>.

ZOU, L.; RUAN, F.; HUANG, M.; LIANG, L.; HUANG, H. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1175–1177, 2020.