



## PROGRAMA DE VOLUNTARIADO ACADÊMICO

### TRADUÇÃO LIVRE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS SOBRE O COVID-19

Este projeto visa realizar a tradução livre de artigos científicos relacionados ao COVID-19, publicados em revistas internacionais de renome, com o objetivo de fornecer material traduzido e facilitar a compreensão e acesso à informação relevante aos profissionais de saúde de diversas áreas e a população em geral. Não há conflitos de interesse.

**Título original:** A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection

**Autores:** Chunyan Wang; Wentao Li; Dubravka Drabek; Nisreen M. A. Okba; *et al.*

**Publicado em:** NATURE. May 04, 2020

**DOI:** 10.1038/s41467-020-16256-y

## Um anticorpo monoclonal humano bloqueador da infecção por SARS-CoV-2

O surgimento do novo coronavírus humano, SARS-CoV-2, em Wuhan, China, causou uma epidemia mundial de doença respiratória (COVID-19). Vacinas e terapias direcionadas para o tratamento dessa doença estão em falta atualmente. Aqui, nós relatamos um anticorpo monoclonal humano que neutraliza o SARS-CoV-2 (e SARS-CoV) em meio de cultura. Esse anticorpo de neutralização cruzada objetiva um epítipo comum nesses vírus e pode oferecer potencial para prevenção e tratamento do COVID-19.

### Artigo

A síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é o agente etiológico da Doença induzida pelo Coronavírus 19 (COVID-19), que emergiu na China no final de 2019 e causou a pandemia<sup>1</sup>. A partir de 19 de Abril de 2020, 2.241.778 casos foram reportados por todo o mundo, dos quais 152.551 (6,8%) morreram pela infecção<sup>2</sup>. O SARS-CoV-2 pertence ao subgênero *Sarbecovirus* (gênero

*Betacoronavirus*, família *Coronaviridae*)<sup>3</sup> junto a SARS-CoV, que surgiu em 2002 causando aproximadamente 8.000 infecções com letalidade de 10%. Ambos os vírus cruzaram as barreiras das espécies de reservatório animal e podem causar doenças respiratórias que ameaçam a vida de humanos. Atualmente, nenhuma terapia direcionada está disponível para a COVID-19. Anticorpos monoclonais direcionados para locais vulneráveis nas proteínas de superfície viral são, cada vez mais, reconhecidos como uma promissora classe de drogas contra doenças infecciosas e têm mostrado uma terapêutica eficaz para um número de vírus<sup>4,5</sup>.

Anticorpos neutralizadores de coronavírus primariamente tem como alvo a glicoproteína trimérica Spike (S) na superfície viral que medeia a entrada na célula hospedeira. A proteína S tem duas subunidades funcionais que realizam a ligação celular (a subunidade S1, havendo quatro domínios principais S1A a S1D) e fazem a fusão da membrana viral e celular (a subunidade S2). Potentes anticorpos neutralizadores frequentemente visam a interação local do receptor em S1, desabilitando interações do receptor<sup>6-11</sup>. As extremidades proteicas do SARS-CoV-2 (SARS2-S; 1.273

resíduos, cepa Wuhan-Hu-1) e SARS-CoV (SARS-S; 1.255 resíduos, cepa de Urbani) são 77,5% idênticas pela sequência primária de aminoácidos, são estruturalmente muito similares<sup>12-15</sup> e comumente ligam-se à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) humana como receptor hospedeiro<sup>1,16</sup> através do domínio S1B. A interação com o receptor é conhecida por desencadear mudanças conformacionais irreversíveis na extremidade proteica do coronavírus permitindo a fusão da membrana<sup>17</sup>.

## Resultados

### **Identificação de anticorpos reativos ao SARS-CoV-2.**

A fim de identificar anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2, a reatividade (cruzada) por ELISA foi avaliada contendo anticorpos sobrenadantes de uma coleção de 51 hibridomas SARS-S derivados da imunização de camundongos transgênicos H2L2 que codificam imunoglobulinas quiméricas com variável humana, cadeias pesadas e leves, e regiões constantes de origem de roedores (Tabela suplementar 1). Quatro de 51 hibridomas SARS-S sobrenadantes mostraram reação cruzada ELISA com a subunidade SARS2-S1 (S resíduos 1-681; Tabela suplementar 1), dos quais um (47D11) exibiu atividade cruzada de neutralização de SARS-S e SARS2-S pseudotipo da infecção pelo vírus da estomatite vesicular (VEV). O anticorpo quimérico 47D11 H2L2 foi reformatado para uma imunoglobulina totalmente humana, pela clonagem da variável humana de regiões de cadeia pesada e leve em um isotipo suporte humano de IgG1. O recombinante humano expresso 47D11 foi usado para facilitar caracterização.

### **Propriedades antivirais e bioquímicas do mAb 47D11 humano.**

O anticorpo humano 47D11 se liga a células expressando total comprimento das hastes proteicas de SARS-CoV e SARS-CoV-2 (Fig. 1a). O anticorpo 47D11 foi encontrado para potencialmente inibir a infecção de células VeroE6 com SARS-S e SARS2-S pseudotipo VEV com IC<sub>50</sub> valores de 0,061 e 0,061 µg/ml (Fig. 1b), respectivamente. A infecção autêntica de células VeroE6

com SARS-CoV e SARS-CoV-2 foi neutralizada com IC<sub>50</sub> valores de 0,19 e 0,57 µg/ml (Fig. 1c). Usando ELISA 47D11 foi mostrado como alvo o S1<sub>B</sub> domínio de ligação ao receptor (receptor-binding domain – RBD) de SARS-S e SARS2-S. O 47D11 limita o S1<sub>B</sub> de ambos os vírus com afinidades similares como apresentado pelo ELISA-baseado em metade do valor de concentração efetiva máxima (EC<sub>50</sub>) (0,02 e 0,03 µg/ml, respectivamente; Fig. 2a). O ELISA-baseado na afinidade do anticorpo 47D11 para o “ectodomínio” do espinho (S<sub>ecto</sub>) de SARS-CoV foi maior em relação ao de SARS-CoV-2 (EC<sub>50</sub> valores: 0,018 e 0,15 µg/ml, respectivamente), apesar de o revestimento equimolar do antígeno (Suplementar Fig. 1). De acordo com as reatividades do ELISA, a medida da ligação cinética de 47D11 pela interferometria de camada biológica mostrou que o 47D11 se liga ao SARS-S<sub>ecto</sub> com alta afinidade (equilíbrio dissociante constante [K<sub>D</sub>]: 0,745 nM) em relação ao SARS2-S<sub>ecto</sub> (K<sub>D</sub> 10,8 nM), enquanto que a afinidade para SARS-S1<sub>B</sub> e SARS2-S1<sub>B</sub> foi uma faixa semelhante (16,1 e 9,6 nM, respectivamente; Suplementar Fig. 2). Essa diferença pode se originar das diferenças na acessibilidade de epítomos em SARS-S contra SARS2-S, como o domínio B pode adotar uma conformação fechada e aberta no spike homotrimérico de pré-fusão<sup>12,13</sup>. Notavelmente, a ligação de 47D11 para SARS-S1<sub>B</sub> e SARS2-S1<sub>B</sub> não competiram com a S1<sub>B</sub> logando com o ECA2 receptor expresso na superfície da célula como apresentado pela citometria (Fig. 2b; Suplementar Fig. 3) nem com S<sub>ecto</sub> e S1<sub>B</sub> ligando a ECA2 solúvel em ensaio baseado em fase sólida (Suplementar Fig. 4), enquanto que dois SARS-S1 anticorpos específicos 35F4 e 43C6 que neutralizam SARS-S (mas não SARS2-S) pseudotipos de infecção por VEV (Suplementar Fig. 5) fazem o bloqueio da ligação do SARS-S<sub>ecto</sub> e SARS-S1<sub>B</sub> com a ECA2. Usando um ensaio por fusão de células marcadas por tripsina, o 47D11 foi apresentado para prejudicar a SARS-S e SARS2-S a mediar a formação de sincícios (Suplementar Fig. 6). Nossos dados mostram que o 47D11 neutraliza SARS-CoV e SARS-CoV-2 através de um mecanismo ainda desconhecido que é diferente da interferência ligação-receptor. Mecanismos alternativos de neutralização de coronavírus pelo RBD-objetivando anticorpos, têm sido relatados incluindo inativação do espinho através da desestabilização induzida por

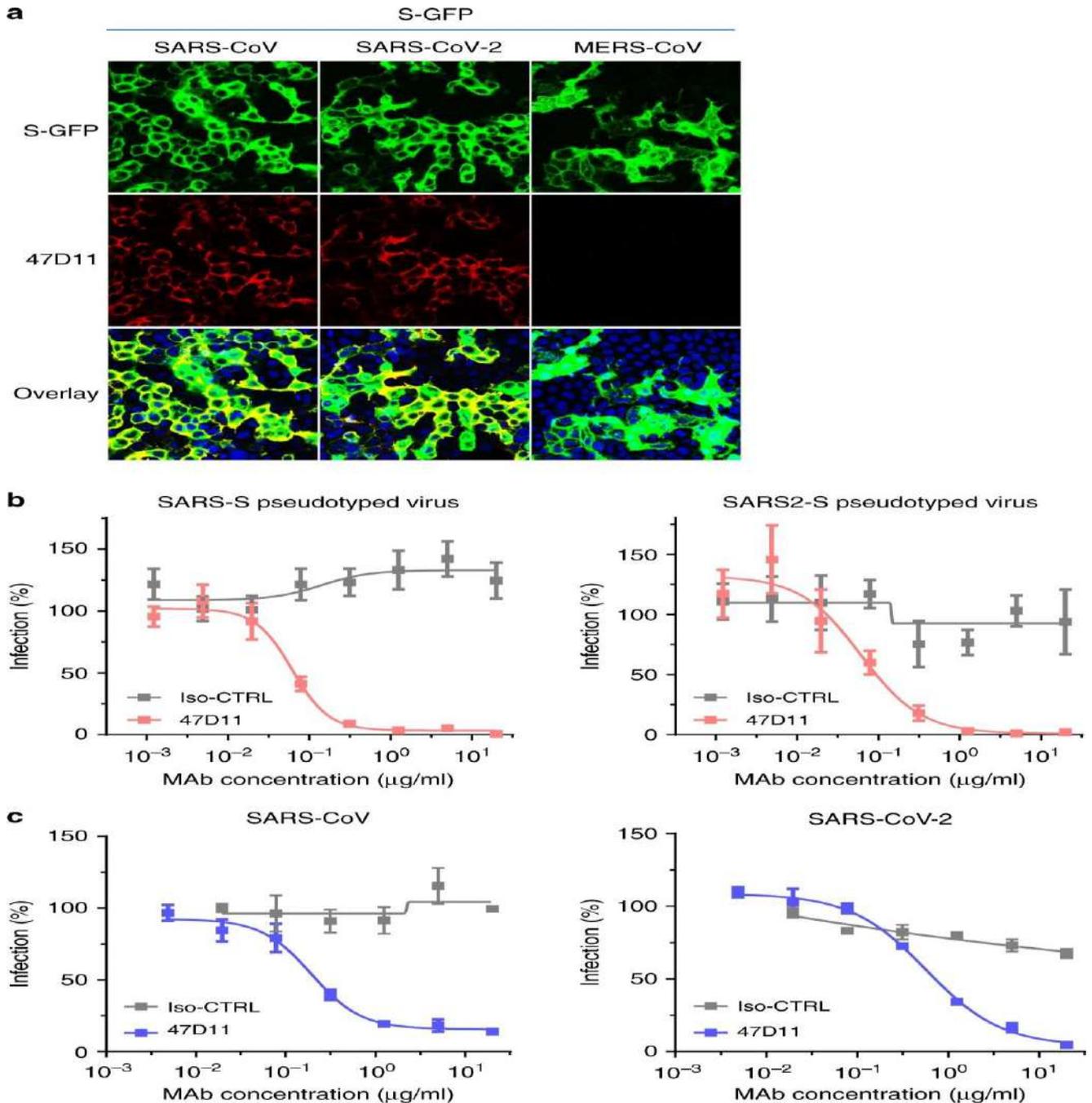
anticorpo em sua estrutura de pré-fusão<sup>17</sup>, a qual pode também aplicar para 47D11.

#### **47D11 tem como alvo o epítopo conservado no domínio SARS2-S-S1<sub>B</sub>.**

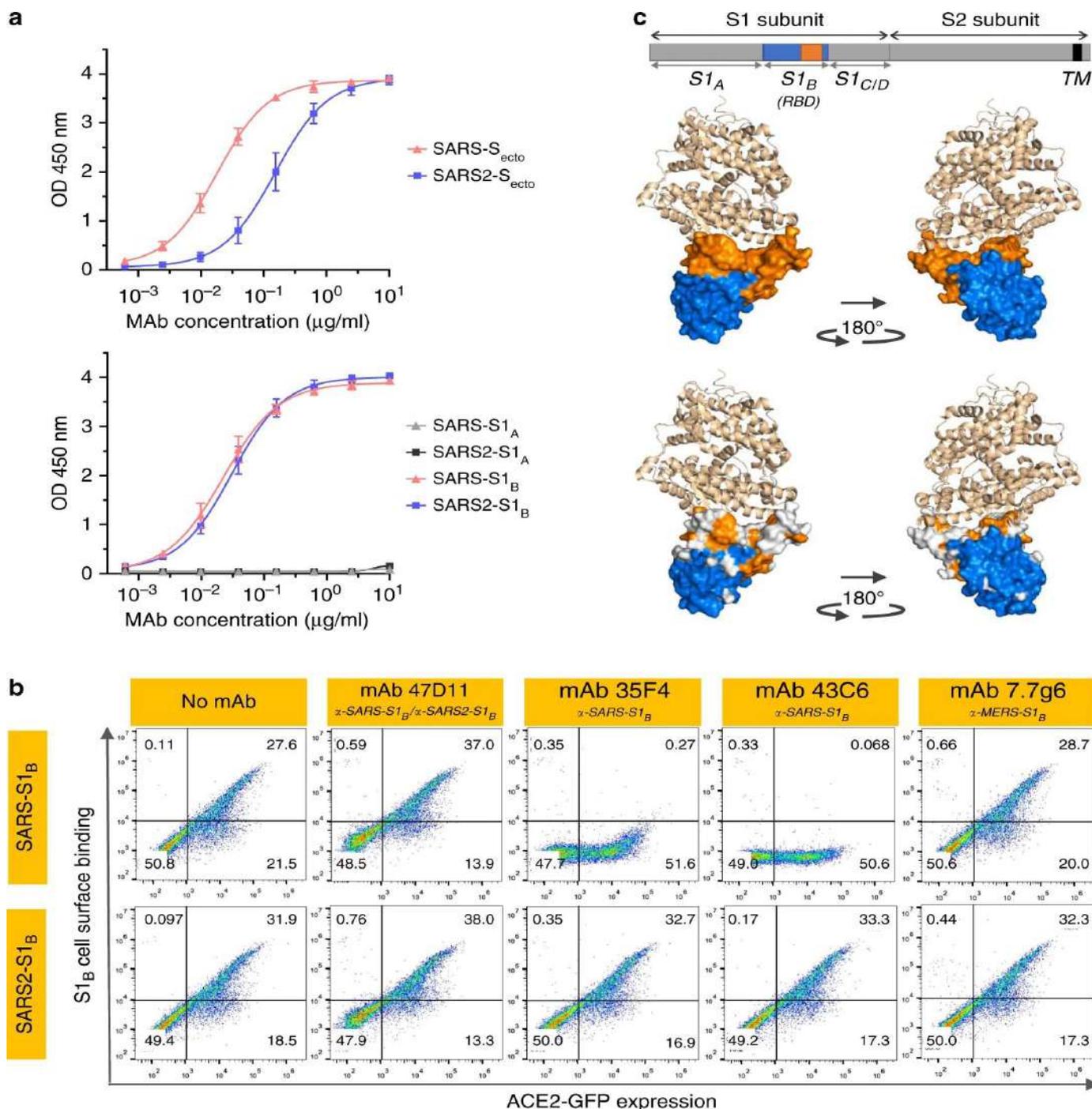
O SARS2-S1<sub>B</sub> RBD (resíduos 338-506) consiste em um núcleo domínio e um subdomínio ligação-receptor (resíduos 438-498) saindo da estrutura de domínio principal antiparalela folha beta (betasheet) que envolve diretamente o receptor. Comparado com o principal domínio S1<sub>B</sub>, a identidade da sequência proteica do receptor S1<sub>B</sub> interagindo com o subdomínio de SARS-S e SARS2-S é substancialmente menor (46,7% contra 86,3%; Suplementar Fig. 7 e Fig. 2c). Anticorpos neutralizantes potentes geralmente têm como alvo esse subdomínio de ligação-receptor. Entretanto, devido a variações comuns neste subdomínio, estes anticorpos são geralmente vírus específicos e se ligam e neutralizam vírus relacionados insuficientemente<sup>18,19</sup>. A reação-cruzada natural de 47D11 indica que o anticorpo é mais provável para atingir a conservada estrutura do núcleo de S1<sub>B</sub> RBD. Curiosamente, o anticorpo neutralizador de SARS-CoV CR3022, que também tem como alvo o principal domínio S1<sub>B</sub>, foi recentemente encontrado para a ligação cruzada SARS-CoV-2, embora sua capacidade de neutralizar a infecção por SARS-CoV-2 não ter sido reportada<sup>18,20</sup>. A ligação S1<sub>B</sub> pelo 47D11 mais longe da interface da ligação-receptor, explica sua incapacidade para comprometer a interação entre o

espinho e o receptor e abre possibilidades para a combinação de tratamentos com anticorpos neutralizadores potentes não competitivos, que se ligam ao subdomínio de ligação ao receptor. Combinações de anticorpos visando epítopos não sobrepostos podem agir sinergicamente, resultando em menor dosagem e podem atenuar o risco de fuga imune<sup>20</sup>.

Em conclusão, este é o primeiro relatório de um anticorpo monoclonal (humano) que neutraliza SARS-CoV-2. O 47D11 liga-se a um epítopo conservado no espinho RBD explicando sua capacidade para neutralização cruzada de SARS-CoV e SARS-CoV-2, usando um mecanismo que é independente da inibição da ligação-receptor. Este anticorpo será útil para o desenvolvimento de testes de detecção do antígeno e ensaios sorológicos com alvo no SARS-CoV-2. Anticorpos neutralizadores podem alterar o curso da infecção no hospedeiro infectado, suportando o curso do vírus ou protegendo um hospedeiro não infectado que é exposto ao vírus<sup>4</sup>. A partir disso, este anticorpo – sozinho ou em combinação – oferece potencial para prevenir e/ou tratar a COVID-19, e possivelmente também outras futuras doenças que surgirão em humanos causadas por vírus do subgênero *Sarbecovirus*.



**Fig. 1. 47D11 neutraliza SARS-CoV e SARS-CoV-2.** **a.** Ligação de 47D11 para células HEK-293T expressando proteínas spike marcadas com GFP de SARS-CoV e SARS-CoV-2 detectadas pelo teste de imunofluorescência. O mAb humano 7.7G6 direciona ao domínio da espícula MERS-CoV S1<sub>B</sub> foi levada como controle negativo, os núcleos celulares nas imagens de sobreposição são visualizados com DAPI. **b.** Neutralização mediada por anticorpos da infecção pelo VEV que codifica partículas luciferase pseudotipadas com proteínas spike de SARS-CoV e SARS-CoV-2. Partículas do pseudotipo VEV pré-incubadas com anticorpos nas concentrações indicadas (ver Métodos) foram usadas para infectar células VeroE6, e atividades luciferase nas células lisadas foram determinadas em 24 horas após transdução para calcular a infecção (%) em relação aos controles não tratados com anticorpos. A média ± SD de, pelo menos, três experimentos independentes com triplicados técnicos é mostrada. Iso-CTRL: um anti-Strep-tag anticorpo monoclonal humano<sup>11</sup> foi usado como um anticorpo isotipo controle. **c.** Neutralização mediada por anticorpos da infecção de SARS-CoV e SARS-CoV-2 em células VeroE6. O experimento foi realizado com amostras triplicadas, a média ± SD é mostrada. As fontes dos dados são fornecidas como uma fonte de arquivo de dados (Source Data file).



**Fig. 2** O 47D11 mAb neutralizante liga SARS1-S e SARS2-S RBD sem eliminar a interação de receptores. **a.** Curvas de ligação em ELISA do 47D11 ao S<sub>ecto</sub> (painel superior) ou S1<sub>A</sub> e S1<sub>B</sub> (RBD: domínio de ligação ao receptor) (painel inferior) de SARS-S e SARS2-S revestidos em concentrações equimolares. O  $\pm$  SD normal de dois experimentos independentes com duplicatas técnicas é mostrado. **b.** Interferência de anticorpos com ligação do S-S1B do SARS-CoV e SARS-CoV2 à superfície celular ACE2-GFP analisado por citometria de fluxo. Anteriormente à ligação à célula, S1<sub>B</sub> foi misturado com mAb (mAbs 47D11, 35F4, 43C6, 7.7G6, no formato H2L2) com especificidade indicada na razão molar de mAb:S1<sub>B</sub> de 8:1 (Veja a Fig. 3 Suplementar para uma análise abrangente usando diferentes razões molares de mAb:S1B). Células são analisadas pela expressão de ACE2-GFP (eixo x) e ligação de S1<sub>B</sub> (eixo y). Porcentagens de células que pontuaram negativo, único positivo ou duplo positivo são mostrados em cada quadrante. O experimento foi realizado duas vezes,

um experimento representativo é mostrado. **c.** Divergência em resíduos superficiais em S1<sub>B</sub> de SARS-CoV e SARS-CoV-2. Painel superior: Estrutura da proteína spike do SARS-CoV S1<sub>B</sub> RBD em complexo com o receptor ACE2 humano (PDB: 2AJF)<sup>24</sup>. ACE2 (cor de trigo) é visualizada em forma de fita. O domínio principal de S1<sub>B</sub> (azul) e subdomínio (laranja) são mostrados em forma de superfície usando PyMOL, e são visualizados com as mesmas cores no diagrama linear da proteína spike acima, com as posições das subunidades S1 E S2, o S ectodomínio S<sub>ecto</sub>, os domínios S1 S1A-D e o domínio transmembrana TM indicados. Painel inferior: similar ao painel acima com resíduos superficiais em S1<sub>B</sub> de SARS-CoV que estão em variação com SARS-CoV-2 colorido em branco. Fontes de dados são fornecidas como arquivo Source Data.

## Métodos

### **Expressão e purificação de proteína spike de coronavírus.**

Ectodomínios da spike de coronavírus (S<sub>ecto</sub>) componentes do SARS-CoV-2 (resíduos 1–1213; cepa Wuhan-Hu-1; GenBank: QHD43416.1) e HCoV-OC43 (resíduos 15–1263; cepa Paris; UniProtKB: Q696P8) foram expressas transitoriamente em células HEK-293T com uma trimerização C-terminal e Strep-tag usando o plasmídeo de expressão pCAGGS. Semelhantemente, os vetores de expressão pCAGGS codificando S1 ou seus subdomínios do SARS-CoV (S1, resíduos 1–676; S1<sub>A</sub>, resíduos 1–302; S1<sub>B</sub>, resíduos, 325–533), e SARS-CoV-2 (S1, resíduos 1–682; S1<sub>B</sub>, resíduos 1–294; S1<sub>B</sub>, resíduos 329–538) marcados em C-terminal com domínio Fc IgG de humanos ou ratos ou strep-tag foram gerados como descrito anteriormente<sup>21</sup>. O ectodomínio spike de coronavírus do MERS-CoV (resíduos 19–1262; cepa EMC; GenBank: YP\_009047204.1) e SARS-CoV (resíduos 15–1182; cepa Urbani; GeneBank: AY278741.1) fusionado com trimerização C-terminal, um sítio de clivagem de trombina e uma tag de purificação strep-tag foram clonados in-frame no vetor de expressão pMT\Bip\V5\His. O sítio de clivagem de furina na junção S1/S2 foi mutada para prevenir a clivagem pela furina nesta posição. Ectodomínios spike foram produzidos de modo estável na linhagem celular S2 de *Drosophila*, como descrito anteriormente<sup>22</sup>. Proteínas recombinantes foram purificadas por afinidade a partir da cultura sobrenadante por beads de proteína A-sepharose (GE Healthcare, Catalog# 17-0780-01) ou purificação por beads de streptactina (IBA, Catalog# 2-1201-010). Pureza e integridade de todas as proteínas

recombinantes foram checadas por eletroforese SDS-PAGE e mancha de Coomassie.

### **Geração de mAbs de H2L2.**

Ratos H2L2 foram sequencialmente imunizados em intervalos de duas semanas com S<sub>ecto</sub> purificado de diferentes CoVs na seguinte ordem: HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-OC43, SARS-CoV, e MERS-CoV. Antígenos foram injetados a 20–25 µg/rato usando Adjuvante Stimune (Prionics) preparado a fresco de acordo com a instrução do fabricante para a primeira injeção, enquanto que o impulsionamento foi realizado usando adjuvante Ribi (Sigma). Foram feitas injeções via subcutânea nas virilhas esquerda e direita de 50µl cada e 100 µl intraperitonealmente. Quatro dias após a última injeção, baço e linfonodos foram coletados e hibridomas feitos pelo processo padrão usando a linhagem de células de mieloma SP 2/0 (ATCC#CRL-1581) para fusão. Hibridomas foram rastreados em um ELISA antígeno-específico e selecionados para posterior desenvolvimento, subclonados e produzidos em uma escala menor (100 ml de meio). Para esse propósito, hibridomas foram cultivados em meio livre de soro e proteínas para cultura de hibridomas (PFHM-II (1x), Gibco) com adição de aminoácidos não essenciais 100x NEAA, Biowhittaker Lonza, Catalog# BE13-114E). Anticorpos H2L2 foram purificados a partir da cultura de hibridomas sobrenadantes usando afinidade cromatográfica por proteína G (Merck KGaA, Catalog# 16-266). Anticorpos purificados foram estocados a 4°C até o uso. Os estudos em animais foram realizados sob permissão animal AVD101002016512, aprovado pelo CCD (comitê central para experimentos com animais).

### **Produção de anticorpos humanos monoclonais 47D11.**

Para produção de mAb humanos recombinantes, os cDNAs codificantes das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do mAb 47D11 H2L2 foram clonadas em plasmídeos de expressão contendo a cadeia pesada do IgG1 humano e regiões constantes de cadeia leve kappa de Ig, respectivamente (InvivoGen). Ambos plasmídeos contêm a sequência de sinal de interleucina-2 para viabilizar a secreção eficiente de anticorpos recombinantes. Os mAb humanos recombinantes 47D11 e o isotipo-controle (anti-strep-tag mAb), previamente descrito, ou mAb 7.7G6 foram produzidos em células HEK-293T seguindo transfecção com pares de plasmídeos de expressão de cadeias pesada e leve de IgG1 de acordo com protocolos da InvivoGen. Anticorpos humanos foram purificados de sobrenadantes de cultura celular usando afinidade cromatográfica por Proteína-A. Anticorpos purificados foram estocados a 4°C até o uso.

### **Microscopia de imunofluorescência.**

Ligação de anticorpos às proteínas spike (proteína S) da superfície celular de SARS-CoV, SARS-CoV-2, e MERS-CoV foi medida por microscopia de imunofluorescência. Células HEK-293T (ATCC#CRL-3216) semeadas em lâminas foram transfectadas com plasmídeos codificando SARS-S, SARS2-S, or MERS-S fundidos C-terminais à proteína verde de fluorescência (GFP) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Catalog# 11668019). Dois dias após a transfecção, células foram fixadas por incubação com 2% paraformaldeído em tampão fosfato-salino (PBS) por 20 min em temperatura ambiente e corada para núcleo com 4,6-diamino-2-fenilindol (Sigma, Catalog# D9542). Células foram subsequentemente incubadas com mAbs a uma concentração de 10 µg/ml por uma hora à temperatura ambiente, seguida por incubação com Alexa Fluor 594 conjugado com anticorpos de cabra anti-IgG humano diluídos a 1:200 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Catalog# A-11014) por 45 min a temperatura ambiente. As imagens de fluorescência foram gravadas usando um microscópio confocal Leica Spell.

### **Ensaio de inibição da ligação ao receptor baseado em citometria de fluxo.**

A interferência do anticorpo na ligação do S1<sub>B</sub> ao receptor ACE2 humano na superfície celular foi medida por citometria de fluxo. Células HEK-293T foram semeadas à densidade de  $2,5 \times 10^5$  células por ml em um frasco T75. Após alcançar 70~80% de confluência, as células foram transfectadas com um plasmídeo de expressão codificando ACE2 humano fundido no terminal C ao GFP usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Dois dias após a transfecção, células foram dissociadas pela solução de dissociação celular (Sigma-aldrich, Merck KGaA; Catalog# C5914). Em todas, 2,5 µg/ml de SARS-S1<sub>B</sub> e SARS2-S1<sub>B</sub> marcados com Fc humano foram pré-incubados com mAb na razão molar indicada de mAb : S1<sub>B</sub> por 1 hora em gelo e submetida à citometria de fluxo. Suspensões de uma célula em amortecedor FACS foram centrifugadas a 400×g por 10 min. Células foram subsequentemente incubadas com uma mistura de S1<sub>B</sub> e mAb por 1 hora no gelo, seguida por incubação de anticorpos de cabra anti-IgG humano (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Catalog# A11014) com Alexa Fluor 594 diluído em 1:200, por 45 min a temperatura ambiente. Células foram submetidas à análise por citometria de fluxo com um Citômetro de Fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter). Os resultados foram analisados por FlowJo (versão 10). Portões FSC/SSC foram usados para selecionar células mononucleares. Coloração de anticorpos de controle foi usada para definir populações celulares positivas/negativas.

### **Ensaio para neutralização de pseudotipo viral**

Produção de VSV pseudotipados com SARS-S e SARS2-S foi realizada como descrito anteriormente, com algumas adaptações<sup>11</sup>. Brevemente, células HEK-293T foram transfectadas com vetores de expressão pCAGGS codificantes de SARS-S or SARS2-S carregando caudas citoplasmáticas truncadas de 28 a 18 aminoácidos, respectivamente. Um dia após a transfecção, células foram infectadas com o VSV-G pseudotipado VSVΔG carregando o gene repórter da luciferase de vaga-lumes (*Photinus pyralis*). Vinte e quatro horas depois, sobrenadantes contendo partículas VSV pseudotipadas em SARS-S/SARS2-S foram coletadas e titulados nas

células VeroE6 (ATCC#CRL-1586) em rins de macaco verde africano. No ensaio de neutralização do vírus, mAbs foram diluídos em série quadruplicamente por duas vezes a concentração final desejada em DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (Bodinco), 100 U/ml de Penicilina e 100 µg/ml de Streptomomicina (Lonza, Catalog# 17-602E). Os mAbs diluídos foram incubados com um volume igual de partículas do pseudotipo VSV por 1 hora a temperatura ambiente, inoculado em monocamadas de confluyente VeroE6 em 96 placas de titulação, e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade da luciferase foi medida um luminômetro de placas Berthold Centro LB 960 usando D-luciferina como substrato (Promega). A porcentagem de infectividade foi calculada pela razão de leitura de luciferase na presença de mAbs normalizados e a leitura de luciferase na ausência de mAbs. A metade da concentração máxima de inibição (IC<sub>50</sub>) foi determinada usando a regressão logística de quatro parâmetros (GraphPad Prism version 8).

### Ensaio de neutralização de vírus

Neutralização de SARS-CoV e SARSCoV-2 autênticos foi realizada usando teste de neutralização por redução de placas como descrito anteriormente, com algumas modificações<sup>23</sup>. Resumidamente, mAbs foram diluídas duas vezes em série em meio de cultura começado em 40 µg/ml e 50 µl deste foram misturados com 50 µl (500 TCID<sub>50</sub>) de SARS-CoV ou SARS-CoV-2 por 1 hora. A mistura foi então adicionada às células VeroE6 e incubada por 1 hora, após a qual as células foram lavadas e posteriormente incubadas em média por 8 horas. As células foram então fixadas e coradas usando soro de coelho anti-SARS-CoV (Sino Biological) e uma peroxidase de cabra rotulada secundariamente com anti-IgG de coelho (Dako). O sinal foi desenvolvido usando um precipitado formando substrato TMB (True Blue, KPL) e o número de células infectadas por poço foi contado usando ImmunoSpot Image analyzer (CTL Europe GmbH). A metade da concentração máxima de inibição (IC<sub>50</sub>) foi determinada usando a regressão logística de quatro parâmetros (GraphPad Prism version 8).

### Análise por ELISA da ligação de anticorpos a antígenos spike de CoV.

Placas NUNC Maxisorp (Thermo Scientific) foram cobertos com quantidades equimolares de antígenos a 4°C durante a noite. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (polissorbato 20) e bloqueadas com albumina de soro bovino a 3% (Bio-Connect) em PBS contendo 0,1% de Tween-20 a temperatura ambiente por 2 horas. Quatro diluições em série de mAbs começando em 10 µg/ml (diluído em buffer de bloqueio) foram adicionadas e as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes e incubadas com peroxidase de rábano (HRP)-conjugado ao anticorpo de cabra anti-anticorpo secundário humano (ITK Southern Biotech) diluído 1:2000 em buffer de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Um anticorpo conjugado HRP anti-StrepMAB (IBA, Catalog# 2-1509-001) foi usado para corroborar a cobertura equimolar de antígenos spike strep-tagged. A atividade HRP foi medida a 450 nanômetros usando substrato tetrametilbenzidina (BioFX) e um leitor de placa de ELISA (EL-808, Biotek). Os valores de ligação à metade da concentração máxima efetiva (EC<sub>50</sub>) foram calculados por uma regressão não linear das curvas de ligação usando GraphPad Prism (versão 8).

**Resumo do comunicado.** Maiores informações quanto ao modelo da pesquisa está disponível no Nature Research Reporting Summary anexado a este artigo.

### Disponibilidade de dados.

Os dados subjacentes às Figs. 1b, c, 2a, Figs. suplementares 1, 2, 4, e 5 são fornecidos como arquivos de Banco de Dados. Anticorpos e sequência de anticorpos estão disponíveis (contactando Vincent Rijsman do Escritório de Suporte de Pesquisas da Universidade de Utrecht; V.M.C.Rijsman@uu.nl) para propósitos de pesquisas apenas sob um MTA (acordo para transferência de materiais), o que permite o uso da sequência de anticorpos para propósitos não comerciais, mas não a sua divulgação para terceiros. Todos os demais dados estão disponíveis a partir do autor correspondente mediante pedidos razoáveis.

**Recebido:** 27 de Março de 2020; **Aceito:** 23 de Abril de 2020;

**Publicado online:** 04 de maio de 2020.

### Referências

1. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 1–4 (2020). 2. World Health Organization. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200419-sitrep-90-covid-19.pdf?sfvrsn=551d47fd\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200419-sitrep-90-covid-19.pdf?sfvrsn=551d47fd_4). 3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544 (2020).

4. Prabakaran, P. et al. Potent human monoclonal antibodies against SARS CoV, Nipah and Hendra viruses. *Expert Opin. Biol. Ther* 9, 355–368 (2009). 5. Saphire, E. O., Schendel, S. L., Gunn, B. M., Milligan, J. C. & Alter, G. Antibody-mediated protection against Ebola virus. *Nat. Immunol.* 19, 1169–1178 (2018). 6. Reguera, J. et al. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 8, e1002859 (2012). 7. Yu, X. et al. Structural basis for the neutralization of MERS-CoV by a human monoclonal antibody MERS-27. *Sci. Rep.* 5, 13133 (2015). 8. Prabakaran, P. et al. Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor-binding domain complexed with neutralizing antibody. *J. Biol. Chem.* 281, 15829–15836 (2006). 9. Hwang, W. C. et al. Structural basis of neutralization by a human anti-severe acute respiratory syndrome spike protein antibody, 80R. *J. Biol. Chem.* 281, 34610–34616 (2006). 10. Rockx, B. et al. Structural basis for potent cross-neutralizing human monoclonal antibody protection against lethal human and zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus challenge. *J. Virol.* 82, 3220–3235 (2008). 11. Widjaja, I. et al. Towards a solution to MERS: protective human monoclonal antibodies targeting different domains and functions of the MERS coronavirus spike glycoprotein. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 516–530 (2019). 12. Wrapp, D. et al.

Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263 (2020). 13. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6 (2020). 14. Yuan, Y. et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat. Commun.* 8, 15092 (2017). 15. Gui, M. et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res.* 27, 119–129 (2017). 16. Li, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454 (2003). 17. Walls, A. C. et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion. *Cell* 176, 1026–1039.e15 (2019). 18. Tian, X. et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 382–385 (2020). 19. Menachery, V. D. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 21, 1508 (2015). 20. ter Meulen, J. et al. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med.* 3, e237 (2006). 21. Raj, V. S. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495, 251–254 (2013). 22. Bosch, B. J., Bartelink, W. & Rottier, P. J. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J. Virol.* 82, 8887–8890 (2008). 23. Okba, N. M. A. et al. Sensitive and specific detection of low-level antibody responses in mild middle east respiratory syndrome coronavirus infections. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1868–1877 (2019). 24. Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309, 1864–1868 (2005).

### **Reconhecimentos**

Nós agradecemos Dr. Yoshiharu Matsuura (Universidade de Osaka, Japão) pela provisão do vírus VSV-G pseudotipado VSVΔG-luc codificador de

luciferase, e Yongle Yang, Michael van der Reijden e Rick Janssens pelo suporte técnico. Nós agradecemos Christian Drosten (Charité Universitätsmedizin Berlin, Alemanha) pela provisão do vírus SARS-CoV-2. Esse estudo foi realizado dentro da estrutura de trabalho do National Centre for One Health (NCOH), o centro de Imunologia Molecular de Utrecht— Universidade de Utrecht e a Iniciativa sobre Medicamentos Inovadores (IMI) Iniciativa de Antecipação e Preparação Zoonótica [projeto ZAPI; grant agreement no. 115760]. Os ratos usados neste estudo foram gerados por Harbour Antibodies BV, um companhia derivada da Harbour Biomed (<http://www.harbourbiomed.com>). C. Wang foi apoiado por uma concessão do Conselho de Bolsas de Estudos da China (arquivo número CSC201708620178).

### Contribuições dos autores

B.J.B. concebeu, projetou e coordenou o estudo. C.W., W.L., N.M.A.O., R.v.H., e D.D. conduziram os experimentos. D.D., B.L.H., e B.J.B. supervisionaram parte dos experimentos. Todos os autores contribuíram com as interpretações e conclusões apresentadas. B.J.B. escreveu o manuscrito, B.L.H., F.J.M.K., A.D.M.E.O., e F.G. participaram na edição do manuscrito.

### Conflito de interesses

Uma aplicação de patente foi submetida em 12 de Março de 2020 para anticorpos monoclonais marcando

SARS-CoV-2 (Aplicação de patente do Reino Unido no. 2003632.3; requerentes de patente: Universidade de Utrecht, Erasmus Medical Center e Harbour BioMed). F.G., D.D., e R.v.H. são acionistas não substanciais na Harbour Biomed e foram parte da equipe que gerou os ratos.

### Informações adicionais

**Informação suplementar** está disponível para este documento em <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16256-y>.

**Correspondência** e solicitação de materiais devem ser endereçadas a B.-J.B.

**Informações da revisão em pares:** Nature Communications agradece todos os revisores anônimos por sua contribuição para a revisão em pares deste trabalho.

**Reimpressões e informações sobre permissões** disponível em <http://www.nature.com/reprints>

**Nota do editor:** Springer Nature permanece neutra com relação a jurisdições em materiais publicados e afiliações institucionais.

### Open Access

---

**Traduzido por**<sup>1</sup>: Lucas Augusto Marcon e Rachel Yukie Toyama

**Revisado por**<sup>1</sup>: Larissa Panatta e Marcella Dellatorre Pucci

**Supervisão**<sup>2</sup>: Dr. Eduardo Gomes

1. Acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Toledo.
2. Médico urologista e professor do curso de Medicina da UFPR, campus Toledo