

LUCIANA DE SOUZA FERNANDES

**PRODUÇÃO DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DO
CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE 2
UTILIZANDO *Komagataella phaffii***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Fernandes, Luciana de Souza, 1994-
F363p
2024
Produção do domínio de ligação ao receptor (RBD) do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 utilizando *Komagataella phaffii* / Luciana de Souza Fernandes. – Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2024.

Referências bibliográficas: f. 58-69.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.451>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. SARS-CoV-2. 2. Receptores de coronavírus .
3. COVID-19 (Doença) - Diagnóstico. 4. Proteínas recombinantes. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 23. ed. 616.2414


LUCIANA DE SOUZA FERNANDES

**PRODUÇÃO DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DO
CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE 2
UTILIZANDO *Komagataella phaffii***


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de julho de 2024

ASSENTIMENTO:

Documento assinado digitalmente
 LUCIANA DE SOUZA FERNANDES
Data: 24/07/2024 15:49:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luciana de Souza Fernandes
Autora

Documento assinado digitalmente
 SERGIO OLIVEIRA DE PAULA
Data: 24/07/2024 17:30:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sérgio Oliveira de Paula
Orientador

*Aos meus pais, Luciano e Márcia, e minha
irmã Mariana, dedico este trabalho, vocês
são minhas maiores inspirações!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me prover a força e coragem para continuar em frente sempre.

Aos meus pais, Luciano e Márcia, por se dedicarem a vida toda para que eu pudesse seguir nesta jornada, que me deram a base fundamental de humanidade, caráter e força que carrego como exemplo. Nada teria alcançado não fosse por vocês.

À minha irmã, Mariana, mesmo sendo mais nova, diversas vezes me levantou com conselhos e palavras de sabedoria e carinho.

Ao Higor, meu amor, meu parceiro, meu amigo, muito obrigada por tudo. Por todos os caminhos que poderia ter percorrido, o que me levou a você, sem dúvidas, foi o melhor que poderia imaginar.

Ao Sérgio, professor e orientador, por ter me recebido no LIVM, pela confiança e apoio durante todos estes anos. Obrigada por me proporcionar o ambiente para crescer como profissional e pessoa.

Ao Roberto, pela amizade e por todo o suporte desde a minha chegada no LIVM, sua presença foi fundamental.

À minha estagiária, Fabiana, cuja ajuda foi essencial durante todo o meu doutorado, que sempre demonstrou disposição e proatividade, e preencheu com alegria todos os momentos, mesmo quando os resultados não eram os esperados.

A todos os queridos amigos do LIVM, em especial Adrielle, Flávia e José, que tornaram o ambiente de trabalho muito mais leve e agradável. Nossos cafés com bolo, momentos necessários de pausa e descontração, sempre estarão em minha memória.

À Universidade Federal de Viçosa, por ser minha casa desde 2012. Por ter me proporcionado tantos aprendizados que me levaram a ser quem eu sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior. Brasil – CAPES – Código de financiamento (001).

BIOGRAFIA

Luciana de Souza Fernandes, nascida em 02 de maio de 1994, na cidade de Cataguases, Minas Gerais. Iniciou sua formação básica nas escolas Coronel Vieira e Dr. Norberto Custódio Ferreira e ensino médio no Colégio Equipe Cataguases. Em 2012, iniciou sua graduação em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde desenvolveu atividades de monitoria, de extensão como membro do Programa de Educação Tutorial em Bioquímica e de pesquisa como bolsista de iniciação científica. Durante 2014 a 2015 participou do programa Ciências sem Fronteiras na State University of New York at Albany, onde cursou disciplinas complementares ao curso de Bioquímica e realizou estágio em pesquisa na área de Química Forense junto ao grupo do Dr. Igor Lednev. Em 2018 iniciou o mestrado em Biologia Celular e Estrutural na UFV sob orientação do Professor Sérgio Oliveira de Paula, o qual teve como foco a avaliação de compostos sintéticos como antivirais contra o arbovírus Mayaro. Em 2020 iniciou o doutorado em Biologia Celular e Estrutural na UFV, sob mesma orientação, no qual desenvolveu atividades relacionadas a expressão heteróloga de proteínas do SARS-CoV-2 para aplicações biotecnológicas como desenvolvimento de kits diagnóstico e vacinas. No ano de 2023, participou do programa de Doutorado Sanduíche na University of Texas Medical Branch at Galveston, no qual integrou o grupo de pesquisa do Dr. Pei-Yong Shi e Dr. Xuping Xie. Durante este período, desenvolveu atividades focadas no estudo de estratégias terapêuticas para vírus emergentes e reemergentes, utilizando técnicas de genética reversa para obtenção de clones infecciosos do vírus Dengue contendo mutações de resistência a compostos antivirais e ensaios *in vitro* para avaliação de seu impacto sobre a replicação e sensibilidade viral. Além disso, também contribuiu para o estudo de mutações na proteína *Spike* de SARS-CoV-2 relacionadas a termoestabilidade e replicação viral. Em 2024, retornou a UFV para finalizar seu doutorado, um longo processo de formação profissional e pessoal, com um sentimento de orgulho e dever cumprido.

RESUMO

FERNANDES, Luciana de Souza, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Produção do Domínio de Ligação ao Receptor do coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 utilizando *Komagataella phaffii***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2, espécie *Betacoronavirus pandemicum*) emergiu em dezembro de 2019 em Wuhan na China e rapidamente se espalhou pelo mundo, alcançando o status de pandemia em março de 2020. O vírus é transmitido pelo ar por meio de gotículas e aerossóis contaminados, afetando principalmente o trato respiratório. A proteína *spike* (S) está presente na superfície viral, sendo responsável pela ligação ao receptor humano enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) por meio de interação entre ACE2 e o domínio de ligação ao receptor (RBD). A proteína S e o domínio RBD tem sido extensamente empregados em diversas aplicações biotecnológicas. O desenvolvimento de tecnologias nacionais para o controle da pandemia é de extrema importância para o enfrentamento da pandemia e preparo para possíveis pandemias no futuro, de modo que a independência da importação de produtos implica numa resposta mais rápida em emergências de saúde pública. Visto que a produção de antígenos para testes diagnóstico e vacinas contribui para o encarecimento destes produtos, a utilização de leveduras para produção de proteínas recombinantes é uma alternativa atrativa para a produção de antígenos dada sua grande capacidade de expressão, bom custo-benefício e capacidade de escalonamento. Neste contexto, este trabalho descreveu a expressão de RBD das linhagens selvagem, Alfa, Beta e Gama de SARS-CoV-2 utilizando a levedura metilotrófica *Komagataella phaffii*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade. A imunodeteção foi realizada com anticorpo para cauda de polihistidinas, anti-*Spike* e pool de soros de IgG positivos para SARS-CoV-2. Ensaio de deglicosilação com a enzima PNGase F foi realizado para detecção de glicofomas da proteína. Além disso, a identidade das RBDs recombinantes foi confirmada por espectrometria de massas. IgG ELISA foi realizado para verificar a potencial aplicação das RBDs como antígenos de captura e sua capacidade de discriminação entre amostras soropositivas e soronegativas de COVID-19. Diferentes condições de ensaio foram empregadas para melhorar os parâmetros de sensibilidade e especificidade, que variaram de 65.22-73.91% e 58.33-75%, respectivamente. A melhor condição empregou as proteínas

digeridas com a endoglicosidase PNGase F e adição de manose ao tampão de diluição dos soros. O resultado dos testes para as quatro variantes de RBD variaram de sensibilidade de 55-76.09% e especificidade de 59.57-74.47%. RBD da linhagem selvagem teve o melhor resultado, com sensibilidade de 76.09% e especificidade de 74.47%, valores moderados para um teste diagnóstico. Já as RBD recombinantes de Alfa, Beta e Gama obtiveram valores menores, refletindo baixo poder discriminatório entre soros IgG positivos e negativos. Os resultados obtidos indicam que a proteína RBD da linhagem selvagem possui potencial para detecção de anticorpos anti-RBD, porém mais testes de otimização são necessários para melhorar os parâmetros de sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Coronavírus; RBD; COVID-19; Ferramentas diagnósticas.

ABSTRACT

FERNANDES, Luciana de Souza, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2024. **Production of Receptor Binding Domain from Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 using *Komagataella phaffii***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2, *Betacoronavirus pandemicum* specie) emerged in December 2019 in Wuhan, China, and quickly spread around the world, reaching pandemic status in March 2020. The virus is transmitted through the air in contaminated droplets and aerosols and mainly affects the respiratory tract. The spike protein (S) is located on the viral surface and is responsible for binding the human receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) through interaction between ACE2 and the receptor binding domain (RBD). In addition, RBD contains important antigenic sites used in the neutralizing immune response. S protein and RBD have been extensively employed in many biotechnological purposes. The development of national technologies to control the pandemic is extremely important for pandemic preparedness, so that the independence of importing products implies a faster response to public health emergencies. Since the production of antigens for diagnostic tests and vaccines contributes to increase the cost of these products, the use of yeasts to produce recombinant proteins is an attractive alternative to produce antigens given their high protein expression rates, good cost-benefit, and scalability. In this context, this work describes the expression of RBD from SARS-CoV-2 wild type, and Alpha, Beta, and Gamma variants using the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. Recombinant proteins were purified by affinity chromatography. Immunodetection was performed with anti-polyhistidine tag, anti-Spike and pooled sera from COVID-19 seropositive individuals. A deglycosylation assay with enzyme PNGase F was performed to detect protein glycoforms. The identity of the recombinant RBDs was confirmed by mass spectrometry. IgG ELISA was performed to assess the potential of RBDs as capturing antigens and discriminating ability of COVID-19 seropositive and seronegative sera samples. Different assay conditions were employed to improve sensitivity and specificity parameters, which ranged from 65.22-73.91% and 58.33-75%, respectively. The test results for the four RBD variants ranged from sensitivity of 55-76.09% and specificity of 59.57-74.47%. The best condition used proteins digested with the endoglycosidase PNGase F and addition of mannose to the serum dilution buffer. Test results for the four RBD variants ranged in sensitivity from 55-76.09% and

specificity from 59.57-74.47%. RBD from the wild line had the best result, with sensitivity of 76.09% and specificity of 74.47%, moderate values for a diagnostic test. The recombinant RBDs from Alpha, Beta and Gamma variants obtained lower values, reflecting low discriminatory power between positive and negative IgG sera. The results obtained indicate that the wild-type RBD protein has potential for detecting anti-RBD antibodies, but further optimization tests are necessary to improve sensitivity and specificity parameters.

Keywords: SARS-CoV-2; Coronavirus; RBD; COVID-19; Diagnostic tools.

LISTA DE SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
cDNA	DNA complementar
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas
CRT	Complexo de replicação-transcrição
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
ERGIC	Compartimento intermediário do reticulo endoplasmático-golgi
FP	Peptídeo de fusão
FPPR	Região proximal do peptídeo de fusão
HR1-2	Regiões heptadas 1 e 2
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleucina
INF	Interferon
ISG	Genes estimulados por interferon
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>
MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
Mpro	Protease principal
mRNA	RNA mensageiro
Nsp	Proteína não estrutural
ORF	Janela aberta de leitura

PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PL _{pro}	Protease semelhante a papaína
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RIG-1	Gene induzível por ácido retinóico I
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
TMPRSS2	Enzima serina protease transmembrana 2
VMD	Vesículas de membrana dupla
VOC	Variante de preocupação
VOI	Variante de interesse
VUM	Variante sob monitoramento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1. O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2	14
1.2. Genoma e proteínas virais	15
1.3. Proteína <i>Spike</i>	20
1.4. Patogênese viral.....	23
1.5. Variantes de SARS-CoV-2.....	25
1.6. Prevenção e diagnóstico	29
1.7. Expressão de proteínas em leveduras	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. ARTIGO.....	34
ABSTRACT	34
1. INTRODUCTION.....	35
2. MATERIALS AND METHODS	36
2.1. Plasmid vectors and strains.....	36
2.2. <i>E. coli</i> TOP10F cloning.....	37
2.3. <i>K. phaffii</i> KM71H cloning.....	38
2.4. Expression of recombinant SARS-CoV-2 RBD and Alpha, Beta, and Gamma variants.....	39
2.5. Protein purification.....	40
2.6. Western blotting	40
2.7. Glycosidase assay	41
2.8. Protein sequencing.....	41
2.9. Human Serum Samples	41
2.10. Indirect ELISA	42

2.11. Statistical analysis.....	43
3. RESULTS	43
3.1. Cloning of pPICZ α A-RBD-WT and Alpha, Beta, and Gamma variants	43
3.2. Expression and characterization of recombinant RBDs	45
3.3. Protein sequencing.....	49
3.4. Indirect ELISA	50
4. DISCUSSION	52
5. CONCLUSIONS.....	56
6. REFERENCES.....	58
SUPPLEMENTARY DATA.....	70
7. CONCLUSÕES GERAIS	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

Os primeiros casos da infecção causada pelo novo coronavírus, o vírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) surgiram em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China. Nestes casos, pacientes infectados pelo vírus até então desconhecido apresentavam pneumonia [1]. O surto se espalhou rapidamente pelo mundo e se tornou um dos mais graves problemas de saúde pública mundial da história, sendo classificado como pandemia em março de 2020 pela Organização Mundial da Saúde e a doença denominada COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) [2]. Atualmente, já foram registrados mais de 600 milhões de casos do vírus em todo mundo, com quase 7 milhões de óbitos. No Brasil, o número de casos chega a 37,5 milhões, com pouco mais de 700 mil óbitos até o momento [3].

A origem de SARS-CoV-2 é resultado de um evento zoonótico, no qual há transmissão de patógenos de uma espécie para outra previamente não-infectada, neste caso, de mamíferos silvestres para humanos [4]. Os primeiros casos da infecção foram diretamente ligados a mercados de animais, no qual pessoas infectadas tiveram contato direto com animais vivos presentes. A emergência de SARS-CoV-2 divide grandes similaridades com SARS-CoV, o qual também tem origem zoonótica. Nos dois casos, um vírus relacionado ao coronavírus circulava entre morcegos, que atuou como hospedeiro original do vírus. Um hospedeiro intermediário mediou a transmissão para humanos, permitindo a emergência dos coronavírus. De fato, SARS-CoV-2 apresenta alta similaridade entre linhagens de coronavírus que infectam morcegos, tais como BatCovRaTG13, RmYN02, RpYN06 e PrC31. No entanto, estas linhagens ainda possuem diferenças evolutivas suficientes para não serem classificadas como progenitores diretos de SARS-CoV-2, o que sugere, portanto, a existência de um hospedeiro intermediário, que possibilitou o desenvolvimento de um novo coronavírus capaz de infectar humanos [5,6].

No caso de SARS-CoV, mamíferos como civeta e o cão-guaxinim atuaram como hospedeiros intermediários. Estes animais são amplamente comercializados em mercados chineses, servindo a propósitos culinários e utilização de sua pelagem, e são conhecidamente suscetíveis a infecção por coronavírus. Para MERS-CoV, camelos foram identificados como a espécie intermediária. Já para o SARS-CoV-2, acredita-se que o pangolim seria espécie mais provável como hospedeiro intermediário. Porém, é provável que o mesmo evento de escape

zoonótico tenha ocorrido, uma vez que o vírus foi detectado em áreas diretamente relacionadas ao comércio de animais silvestres e domesticados em mercados de Wuhan no início da pandemia, locais em que há grande concentração de diversos mamíferos como pangolins, civetas e cães-guaxinim. Logo, diversas espécies podem ter contribuído para a emergência de SARS-CoV-2 [7–9].

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*, a qual contém os gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. SARS-CoV 2 é parte do gênero *Betacoronavirus*, no qual também estão contidos outros dois coronavírus importantes: SARS-CoV e MERS-CoV, responsáveis por epidemias graves em 2003 e 2012, respectivamente [10]. Após redesignação feita pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 2023, SARS-CoV-2 teve o nome de sua espécie definido como *Betacoronavirus pandemicum* [11]. Apesar disso, a sua abreviatura SARS-CoV-2 se mantém e será utilizada no decorrer deste texto.

1.2. Genoma e proteínas virais

Como o restante de sua família, SARS-CoV-2 é um vírus esférico e envelopado de 120 nm de diâmetro. SARS-CoV-2 tem seu genoma composto de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 30 kb. Ele consiste em 14 ORFs (*open-reading frames*) que incluem duas regiões não-codificantes nas extremidades, e regiões codificantes para proteínas não-estruturais, estruturais e acessórias (Figura 1). As duas primeiras ORFs codificam as 16 proteínas não-estruturais do vírus (Nsp1-16). Elas são denominadas ORF1a e ORF1b e correspondem a ~70% do genoma. Estas proteínas possuem uma variedade de funções e estão diretamente envolvidas na replicação e transcrição do genoma viral e evasão da resposta imune. A porção restante do genoma é responsável por codificar as proteínas estruturais *spike* ou espícula (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), que compõem a partícula viral, e proteínas acessórias, que auxiliam na regulação do ciclo viral [12].

As proteínas não-estruturais são transcritas nas poliproteínas pp1a e pp1ab, a partir de um *frameshift* ribossomal. Nsp1 é clivada da extremidade N-terminal a partir da ação de proteases virais. Apesar de suas funções não serem completamente elucidadas, sabe-se que Nsp1 está envolvida na supressão da expressão proteica da célula hospedeira através da ligação à subunidade ribossomal 40 S e bloqueio da entrada de mRNA celular. Deste modo, há interrupção da síntese proteica celular, enquanto a produção de proteínas virais continua

por mecanismos ainda desconhecidos. Nsp1 também está envolvida na evasão do sistema imune por meio do bloqueio de receptores RIG-1, responsáveis pelo reconhecimento de RNA viral e ativação de defesa antiviral da célula [13].

A função de Nsp2 ainda não foi completamente esclarecida. Em cultura celular, Nsp2 não é essencial para a replicação viral, porém há diminuição no título viral e síntese de RNA quando seu gene é removido [14]. Um estudo demonstrou que Nsp2 inibe a expressão de interferon- β interagindo com o complexo GIGYF2/4EHP, o qual atua na regulação da tradução do mRNA de interferon *infb1*. Nsp2 reforça a ação repressora deste complexo, o que contribui para a evasão da resposta imune inata [15].

SARS-CoV-2 possui duas proteases que atuam no processamento das poliproteínas recém-transcritas do genoma viral. Uma delas é Nsp3, a maior proteína codificada pelo vírus, com 213 kDa. Nsp3 possui diversos domínios, dentre eles, o domínio protease papain-like (PLpro) e o macrodomínio X se destacam. PLpro atua no processamento das poliproteínas pp1a e pp1ab, liberando Nsp1, Nsp2 e Nsp3. Já o macrodomínio X interage com outras Nsps e proteínas celulares e interfere na resposta imune celular. Com atividade hidrolase, o macrodomínio X é capaz de remover ADP-ribose de proteínas celulares, o que interfere em diversas vias de sinalização relacionadas a resposta imune, reparo de DNA e estresse celular [16]. Nsp3 ainda atua na formação das vesículas de membrana dupla (VMD) juntamente com Nsp4 e Nsp6, sítios onde ocorrem replicação e transcrição do genoma viral [17]. A segunda protease de SARS-CoV-2 é Nsp5, também conhecida como Mpro (*main protease*), uma cisteína protease responsável pela clivagem e liberação da maioria das Nsps. Dada sua função essencial para a ciclo viral, Nsp3 e Nsp5 são alvos interessantes no desenvolvimento de inibidores de SARS-CoV-2 [16,18].

Nsp4 e Nsp6 são proteínas transmembrana que atuam como âncora para interação do complexo replicativo com membranas celulares (como o retículo endoplasmático) e intermediam a formação e organização de VMDs na célula hospedeira [19].

O complexo de replicação-transcrição (CRT) dos coronavírus é formado pela associação de diversas Nsps. A polimerase dependente de RNA, Nsp12, catalisa a síntese de RNA viral a partir da sua ligação ao complexo Nsp7-Nsp8, cofatores da polimerase, que possuem função primase, isto é, sintetizam a sequência primer necessária à Nsp12 para iniciar a replicação do RNA. Também interagem com o CRT, Nsp9 e Nsp13. Nsp9 é uma proteína de ligação a RNA fita simples associada a virulência de SARS-CoV-2, participando da regulação

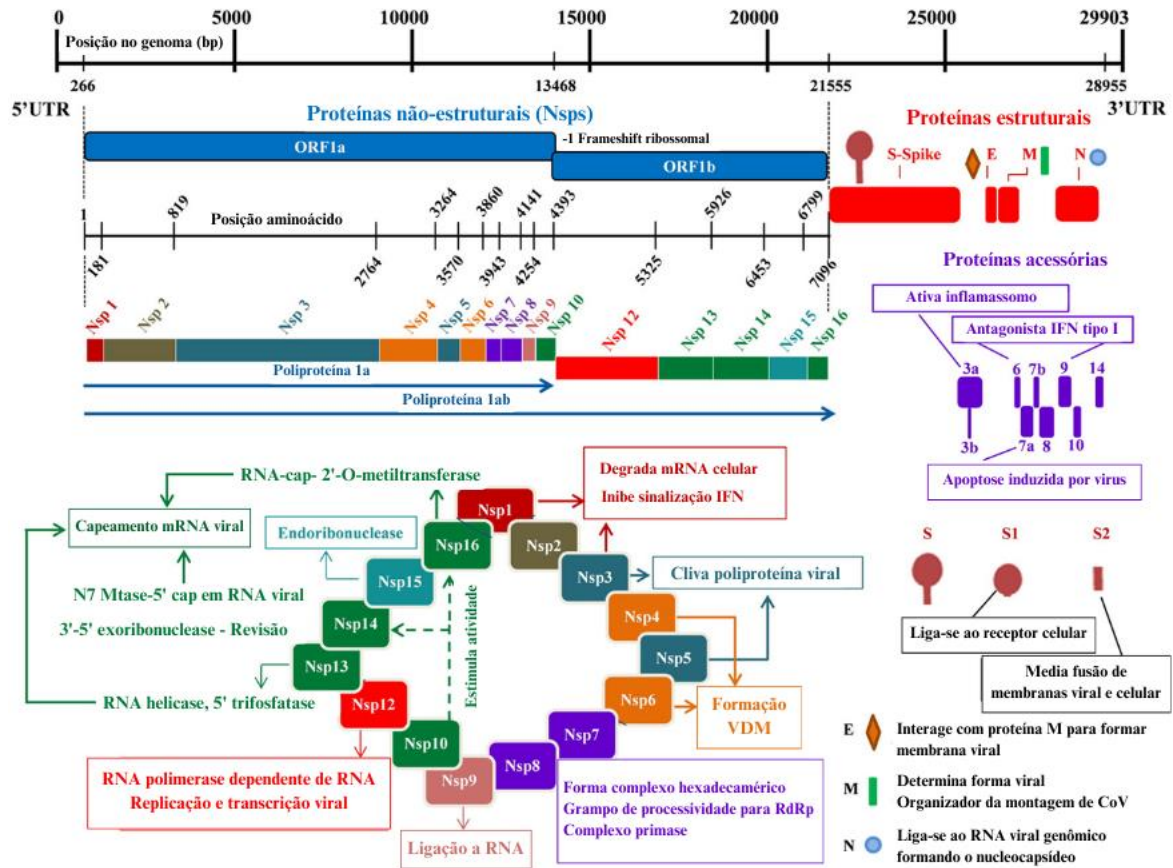
do capeamento do mRNA [20]. Já Nsp13 possui atividades helicase e NTPase, mediando o rearranjo do RNA durante a replicação e transcrição viral, promovendo a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados para adição ao cap do mRNA viral e desfazendo estruturas de RNA duplex que podem surgir durante a replicação e transcrição [21].

Nsp15 está intimamente relacionada à evasão do vírus ao sistema imune. Sua atividade endoribonuclease cliva cadeias de poliuridinas da extremidade 5' do RNA de polaridade negativa gerado durante a replicação. Tais cadeias são consideradas PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e ativam a resposta antiviral da célula hospedeira. Logo, sua eliminação previne a detecção do vírus pela célula [16,22].

As proteínas Nsp10, Nsp14 e Nsp16 atuam em conjunto e interagem com o CRT. Nsp10 promove a integração entre Nsp14 e 16 e atua como cofator estimulando suas atividades de exoribonuclease 3'-5' e 2'-O-metiltransferase, respectivamente. A atividade exoribonuclease de Nsp14 também é denominada de “revisão”, uma vez que há remoção de ribonucleotídeos erroneamente incorporados. Já Nsp16 está envolvida no processo de capeamento do mRNA, por meio da adição de grupos metil ao nucleotídeo adenosina [23].

Nsp11 é uma proteína de 13 aminoácidos sem função definida até o momento. Esta proteína tem origem no processamento da poliproteína pp1a pela ação de clivagem da protease Mpro na junção entre Nsp10 e Nsp11. Super-expressão de Nsp11 do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) suprime a produção de interferon por meio do bloqueio de MAVS e RIG-1 em células MARC-145, de epitélio embrionário de rim de macaco vervet [24]. Gadhve e colaboradores verificaram que Nsp11 é uma proteína intrinsecamente desordenada. Proteínas desta categoria não possuem restrições conformacionais e podem adotar uma variedade de estruturas [25].

Figura 1 – Organização do genoma de SARS-CoV-2 e suas proteínas estruturais e não-estruturais.



Fonte: Adaptado de Arya, R. *et al*, 2021 [22].

As proteínas acessórias de SARS-CoV-2 são codificadas pela mesma ORF de proteínas estruturais (Figura 1). São 9 proteínas (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9, ORF10 e ORF14) com funções que ainda permanecem parcialmente esclarecidas no contexto da infecção viral. Apesar disso, sabe-se que estas proteínas são importantes fatores de virulência para a patogênese viral e evasão do sistema imune. De modo geral, elas estão relacionadas ao processo de inflamação e indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, verificou-se que ORF3a atua como fator pró-apoptótico e ativa o inflamassoma NLRP3. Outras proteínas como ORF3b, ORF6, ORF7a e ORF8 foram implicadas como antagonistas de interferon, bloqueando diferentes proteínas ativadoras desta via. ORF8 ainda foi apontada como indicador diagnóstico para COVID-19, uma vez que é secretada pela célula infectada e pode ser detectada em soros de pacientes [26].

Em relação às proteínas estruturais, SARS-CoV-2 possui quatro: a proteína S, responsável pelo reconhecimento e entrada do vírus à célula. Detalhes de S serão abordados

no próximo tópico; a proteína do nucleocapsídeo (N), que se liga ao genoma viral para formar a estrutura nucleocapsídeo. Além disso, N tem função chaperona e atua na regulação da resposta imune do hospedeiro como antagonista de interferon do tipo I. Devido à sua alta imunogenicidade, N pode ser empregada como antígeno para diagnóstico e desenvolvimento de vacinas e antivirais [27].

A proteína M é uma glicoproteína do tipo III que se organiza em dímeros na superfície viral e tem por função direcionar a montagem e o brotamento da partícula viral, na qual interage com as demais proteínas estruturais [28]. M também atua como regulador negativo da resposta imune inata, a partir da interação com a proteína adaptadora celular MAVS (*mitochondrial-antiviral-signaling protein*), uma proteína utilizada por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) ao detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para mediar a ativação de vias de sinalização antivirais na célula. Em cultura celular, a expressão de M inibiu a transcrição de diversos genes associados à resposta antiviral inata como *IFNB1*, *ISG56*, *CXCL10* e *TNF*. Quando M se liga a MAVS, há o bloqueio de vias que ativam a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e interferon tipo I, como as vias do complexo TRAF2/5/6-IKK e NF- κ B, e do complexo TRAF2/3/5/6-TBK1 e IRF3/7 [29].

A proteína E de SARS-CoV-2 é a menor das proteínas estruturais, com 75 kDa e trata-se de uma viroporina que forma canais de cátion. Apenas uma pequena parte de E expressa é incorporada na partícula viral, a maioria e localiza-se no compartimento intermediário do retículo endoplasmático e complexo de Golgi (ERGIC). Os coronavírus formam sua partícula viral e iniciam o processo de brotamento no ERGIC e E está envolvida no processo de curvatura da membrana plasmática para formação da partícula viral, permitindo que elas adquiram a morfologia esférica [30]. Além disso, está envolvida na regulação do transporte vesicular de vírions e no processo de brotamento da progênie viral. Juntamente com a proteína M, E modula a expressão e aumenta a retenção de S no ERGIC de modo que haja glicosilação da proteína e a acumulação dos componentes estruturais virais para montagem dos vírions [31]. A proteína E é reconhecida pelo receptor *toll-like 2* (TLR2), um PRR, que ativa uma via de sinalização antiviral para síntese de citocinas pró-inflamatórias [32]. Deleção do gene de E diminui significativamente a quantidade de partículas virais formadas e a patogenicidade. Além disso, E foi considerado um fator de virulência, induzindo uma forte resposta inflamatória e morte celular. Alterando o equilíbrio eletroquímico celular, E pode alterar a homeostase iônica e enfraquecer a resposta imune celular [33]. Inibição da atividade

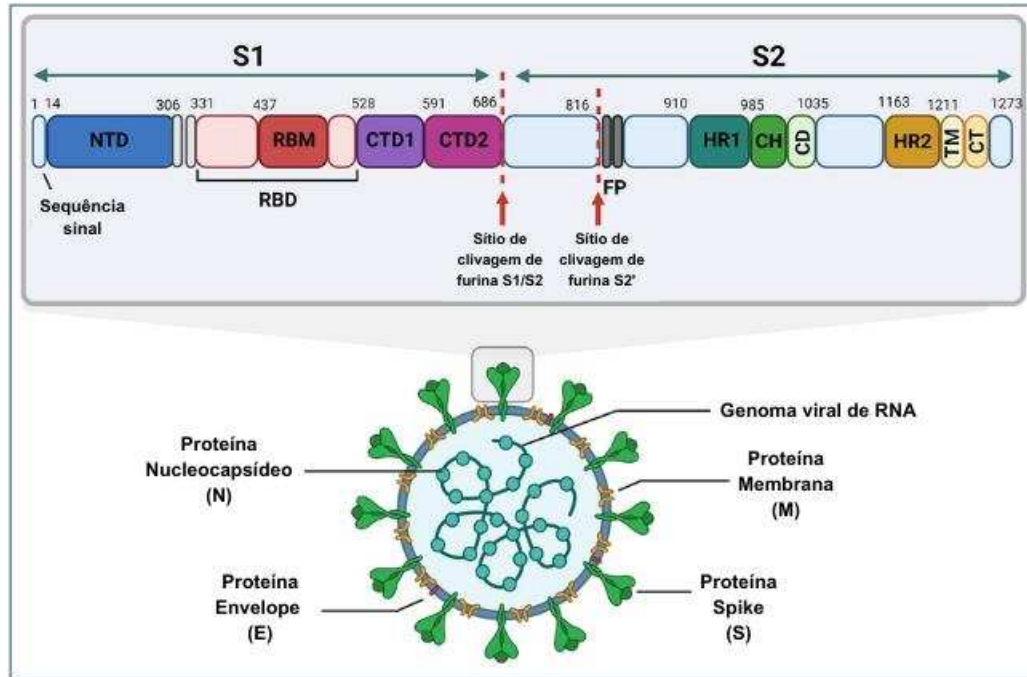
viroporina de E pode ser uma promissora estratégia para o desenvolvimento de drogas anti-SARS-CoV-2.

1.3. Proteína *Spike*

A proteína *spike* (S) é uma glicoproteína de membrana trimérica de 1273 aminoácidos com aproximadamente 180 kDa presente em abundância no envelope de SARS-CoV-2, responsável pela ligação ao receptor humano, enzima conversora de angiotensina II (ACE2) e entrada do vírus à célula a partir da fusão das membranas celular e do envelope. S é composta pelas subunidades S1 e S2 ligadas de forma não-covalente. Cada subunidade possui funcionalidades distintas. S1 é dividida no domínio N-terminal (NTD), domínio de ligação ao receptor (RBD) e os domínios C-terminal 1 e 2 (CTD1 e CTD2) (Figura 2). Dentre eles, o RBD se destaca pela sua função essencial de reconhecimento e ligação ao receptor humano ACE2. Este domínio é também o principal alvo de anticorpos neutralizantes e possui importantes sítios antigênicos. RBD pode adquirir uma conformação em que está acessível para esta interação denominada *up* ou pode estar em uma conformação não-acessível ao receptor, conhecida como *down*. Contido no RBD, o motivo de ligação ao receptor (RBM) é a região que interage diretamente com ACE2, além de ser o local que a maior parte dos anticorpos neutralizantes reconhece [34,35].

Já a subunidade S2 é responsável pela fusão entre as membranas celular e do envelope, e contém o peptídeo de fusão (FP), estrutura que forma um poro entre as membranas e permite a entrada do material genético viral à célula. Outros domínios importantes são a região proximal ao peptídeo de fusão (FPPR) e as repetições heptadas 1 e 2 (HR1-2), os quais permitem que as transições conformacionais de S2 aconteçam para exposição de FP [36,37].

Figura 2 – Organização estrutural da partícula viral e da proteína S de SARS-CoV-2. A proteína S possui diversos domínios definidos. NTD: domínio N-terminal; RBD: domínio de ligação ao receptor; RBM: motivo de ligação ao receptor; CTD1-2: domínios C-terminal; S1/S2: sítio de clivagem de furina; S2': sítio de clivagem de S2; FP: peptídeo de fusão; HR1-2: repetições heptadas 1 e 2; CH: hélice central; CD: domínio conector; TM: domínio transmembrana; CT: cauda citoplasmática.



Fonte: Adaptado de Mistry, P. *et al* (2022) [37].

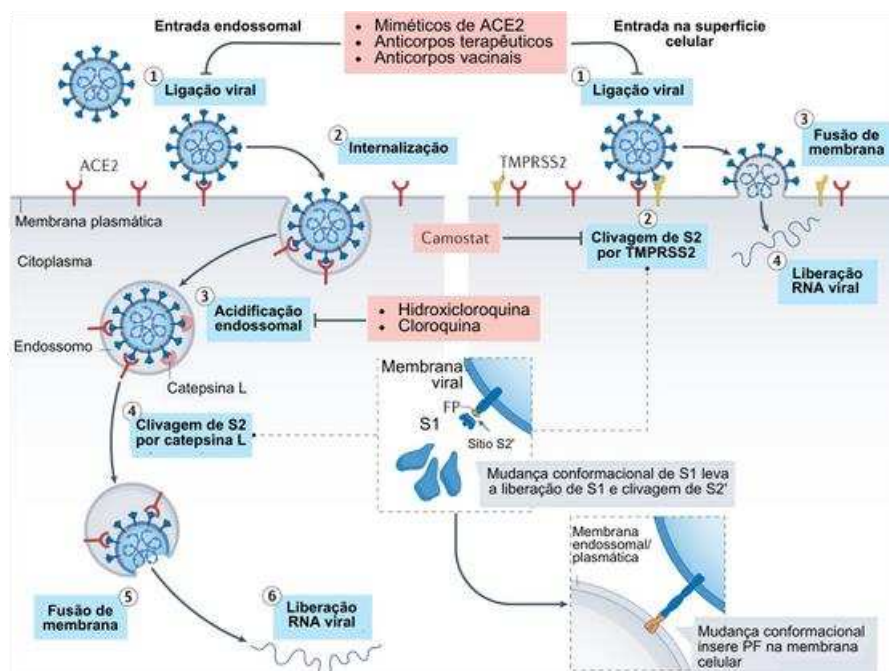
Além disso, S também possui 22 sítios para N-glicosilação, modificações pós-traducionais fundamentais para o correto enovelamento proteico, dinâmica conformacional, processamento por proteases celulares, elicitação da resposta imune humoral e evasão imune. Ao todo, existem 66 sítios para glicosilação em um homotrímero de S [36]. Os glicanos presentes na superfície da proteína podem formar uma espécie de “escudo” para bloquear o acesso de anticorpos neutralizantes a S [38]. Além disso, as glicosilações tem papel essencial na plasticidade conformacional de S, cuja estrutura transita entre os estados “up” “down”. A deleção de sítios de N-glicosilação em RBD gera instabilidade da conformação “up” e afeta, por consequência, a ligação a ACE2 [39].

S possui dois sítios de processamento de proteases celulares fundamentais para garantir a funcionalidade da proteína. O sítio S1/S2, que se encontra na região entre as duas subunidades, é uma região multibásica reconhecida pela protease furina. Para SARS-CoV-2, a furina reconhece o sítio Arg-Arg-Ala-Arg e realiza a ativação proteolítica de S. Este processo faz parte da maturação da proteína S e ocorre durante a montagem da partícula viral, no

complexo de Golgi. O processamento deste sítio é pré-requisito para que a clivagem do segundo sítio ocorra [36].

O segundo sítio de clivagem é denominado S2', e está contido na subunidade S2. O processamento deste sítio é necessário para a entrada do vírus à célula e é realizado pelas proteases TMPRSS2 ou catepsina L, dependendo do modo de entrada no vírus. Em células que expressam a protease transmembrana TMPRSS2 – epitélio intestinal, respiratório e urogenital – o sítio S2' é clivado, permitindo que a subunidade S2 sofra as mudanças conformacionais necessárias para que haja exposição do peptídeo de fusão (Figura 3). De forma alternativa, em células com baixa ou nenhuma expressão de TMPRSS2, o vírus pode ser internalizado por endocitose e o sítio S2' é processado pela protease catepsina L nos endolisossomos. Neste sentido, SARS-CoV-2 garante sua entrada à célula hospedeira por meio de dois mecanismos distintos [36].

Figura 3 – Modo de entrada de SARS-CoV-2 e processamento da proteína S por proteases celulares. Painel esquerdo: o vírus pode ser internalizado via endocitose quando a célula infectada não possui a protease TMPRSS2 em sua superfície. O sítio S2' é então processado pela protease catepsina L no compartimento endossomal, onde há exposição do peptídeo de fusão e formação de um poro conectando as membranas celular e do envelope viral. Painel direito: na presença de TMPRSS2, a entrada do material genético viral ocorre na superfície celular. Diversos agentes podem bloquear a ligação de S ao ACE2 e inibir a entrada viral, como moléculas miméticas, anticorpos terapêuticos e anticorpos gerados por vacinas. O inibidor de serina protease mesilato de camostatato pode inibir TMPRSS2 e restringir esta via de entrada. Compostos como hidroxiquinona e cloroquina podem bloquear a acidificação de endossomos e restringir a via mediada por catepsina L.

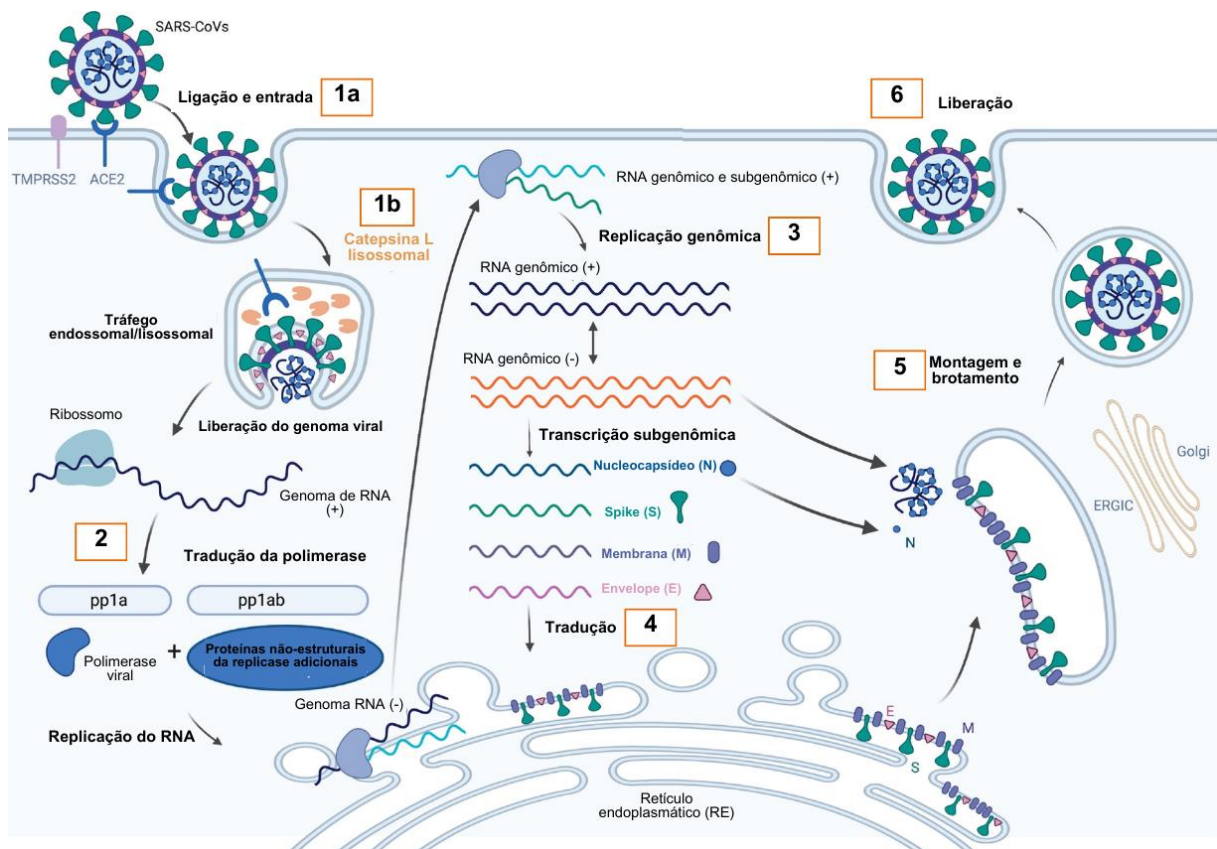


Fonte: Adaptado de Jackson, C. *et al* (2021) [36].

1.4. Patogênese viral

O ciclo de SARS-CoV-2 se inicia com a ligação de S ao receptor humano ACE2 (Figura 4). A entrada do vírus pode ocorrer tanto a partir da membrana plasmática, na qual a ativação proteolítica de S é realizada pela protease celular TMPRSS2 (1a) ou por catepsina L, nos endolisossomos (1b), caso o vírus seja endocitado. A ativação de S permite a formação do poro de fusão entre as membranas da célula e do envelope e libera o genoma viral no citosol. O RNA de polaridade positiva é prontamente traduzido em duas poliproteínas pp1a e pp1ab (2), que originam as proteínas não-estruturais (nsps). As nsps formam o complexo replicativo e de transcrição (CRT) que realiza a replicação e transcrição do RNA genômico (3), sintetizando novas cópias do genoma e RNA subgenômico. Este último é traduzido em proteínas estruturais (4), que formarão as novas partículas virais (5) e serão liberadas da célula infectada (6).

Figura 4 – O ciclo viral de SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Harrison, A. *et al* (2020) [40].

SARS-CoV-2 é transmitido pelo ar por gotículas de saliva e aerossóis que entram em contato com indivíduos não-infectados. Há também a possibilidade de contaminação indireta, no qual o indivíduo pode levar as mãos contaminadas com o vírus em direção a mucosas da boca, nariz e olhos. No entanto, a transmissão por aerossol é a rota mais prevalente no contexto da pandemia tanto por pessoas sintomáticas quanto assintomáticas [41,42]. Espaços fechados e não-ventilados contribuem para o espalhamento de pequenas gotículas de salivas geradas pela fala e respiração. Logo, o uso de máscaras se tornou uma medida imperativa para prevenção da infecção pelo vírus durante a pandemia [43].

A infecção pelo vírus afeta principalmente o trato respiratório. Após o contato com o vírus, ele infecta células do epitélio alveolar e do endotélio vascular e macrófagos alveolares. No momento da infecção, o vírus pode ser detectado por sensores moleculares da resposta imune inata, os PRRs, como os receptores TLR, que ativam cascatas de sinalização para expressão de interferon, genes estimulados por interferon (ISGs), citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além de IFN-I e II, estão entre os mediadores produzidos IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , GM-CSF, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2 e MIP1a [44].

Proteínas virais como E, M e ORF3a são capazes de induzir este quadro inflamatório estimulando a produção destes mediadores além de induzir a apoptose de células infectadas. Agentes da resposta imune inata como macrófagos e neutrófilos são recrutados ao local, amplificando o dano tecidual e comprometendo as trocas gasosas vitais para o funcionamento adequado dos pulmões. A produção excessiva de citocinas ou “tempestade de citocinas” leva ao acúmulo de células imunes, que contribuem para o agravamento do quadro clínico e à gravidade da doença [44].

Com o acúmulo de neutrófilos, há ainda a formação de NETs (*neutrophil extracellular traps*), isto é, grandes agregados de DNA e proteínas liberados por neutrófilos e organizados em uma espécie de “teia”, que possuem atividade antimicrobiana. No contexto da infecção por SARS-CoV-2, NETs contribuem para o agravamento do quadro inflamatório, por meio da liberação de elementos como DNA extracelular, que ativa plaquetas e induz a formação de trombos, e de histonas, que induzem necrose de células do epitélio e endotélio pulmonar [45]. O processo de hiperinflamação também ocorre em outros tecidos, como o epitélio gastrointestinal e o miocárdio, levando a um quadro de inflamação sistêmica com danos permanentes aos órgãos e que pode representar sérios riscos à vida do indivíduo [44].

SARS-CoV-2 tem um período longo de incubação de 3 até 14 dias. Durante este período, o indivíduo pode permanecer assintomático, mas ainda transmitir o vírus. Geralmente, os sintomas surgem 5 dias após a infecção, sendo os mais comuns, febre, fadiga e tosse seca. Sintomas menos comuns incluem dor de cabeça, diarreia, dores no peito, dor de garganta, náusea, vômitos e alterações no olfato e paladar. A doença pode ser classificada em três níveis de acordo com a gravidade da doença: leve, grave e crítica. A maioria dos casos de Covid-19 são classificados como leves a moderados e os indivíduos conseguem se recuperar da doença. Casos graves podem se desenvolver cerca de 8 dias após infecção, caracterizando-se por dispneia e pneumonia, ao passo que pacientes críticos evoluem para síndrome respiratória aguda, lesão cardíaca aguda e falha múltipla de órgãos e há risco de morte. Estes casos necessitam de hospitalização e ventilação mecânica [46].

Manifestações neurológicas também estão associadas à Covid-19. Tontura, confusão e dor de cabeça são comumente relatados entre pacientes. Homens acima de 60 anos apresentam maiores chances de desenvolver quadros mais graves e mais longos da doença. Além disso, comorbidades como hipertensão, diabetes, obesidade e doenças respiratórias crônicas são fatores de risco que contribuem para o agravamento do quadro clínico. Por outro lado, indivíduos mais jovens desenvolvem quadros mais moderados da doença [46–49].

1.5. Variantes de SARS-CoV-2

À medida que SARS-CoV-2 se espalhava pelo mundo, novas variantes do vírus surgiram rapidamente, indicando a grande capacidade de adaptação deste vírus. Este fenômeno ocorre quando há alterações na sequência de nucleotídeos do genoma viral, que no caso de vírus de RNA se manifestam com maior frequência uma vez que a RNA polimerase viral é mais susceptível a erros durante a replicação em relação a vírus de DNA. Apesar dos coronavírus possuírem mecanismos para revisão de erros como a proteína nsp14, sua ação não é suficiente para conter todas as mutações geradas. Mutações que favoreçam replicação, transmissão e infecciosidade do vírus serão mantidas pela seleção natural ao passo que alterações genômicas que forneçam desvantagens ao *fitness* viral serão descartadas. Fatores ambientais como vacinas e antivirais também contribuem para a seleção de novas variantes, uma vez que se tornam uma pressão seletiva ao processo adaptativo do vírus. À medida que medidas de combate ao vírus surgem, linhagens que possuem mutações de escape antigênico serão favorecidas, já que podem driblar a imunidade protetiva conferida por vacinas [50].

Para facilitar a comunicação e evitar equívocos quanto as variantes de SARS-CoV-2, a Organização Mundial da Saúde designou letra do alfabeto grego para identificar cada variante. Além disso, a OMS também classificou as variantes em três categorias de importância: Variantes de Interesse (VOI), Variantes de Preocupação (VOC) e Variantes sob Monitoramento (VUM).

As VOIs são definidas como variantes que apresentam alterações genômicas preditas ou que comprovadamente afetam características que incluem a transmissibilidade, severidade da doença, escape imune, escape terapêutico ou diagnóstico e que ainda são capazes de causar transmissão comunitária em vários países com relativa prevalência e números de casos crescentes ou qualquer outro impacto epidemiológico que sugira um risco à saúde pública global [51].

Por sua vez, VOCs são definidas por todos os critérios descritos para VOIs e ainda estão associadas a um ou mais parâmetros listados a seguir a um nível de significância global de saúde pública: 1) aumento da transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia da COVID-19 ou 2) mudança na virulência ou quadro clínico da doença ou 3) diminuição da efetividade de medidas de saúde pública, sociais ou de diagnóstico, vacinas ou terapêuticos [51].

As VUMs são definidas por apresentarem mudanças genéticas suspeitas de afetarem características virais e que podem representar risco no futuro, porém com evidências insuficientes de seu impacto epidemiológico e que necessitam monitoramento e contínua avaliação [51].

O *status* das variantes pode se alterar de acordo com o país e tempo, à medida que novas medidas de combate são desenvolvidas contra o vírus. Atualmente, não há VOCs e VUMs em circulação, apenas duas VOIs referentes a duas sublinhagens da variante Ômicron. Variantes que não representam mais risco adicional à saúde pública global em comparação com outras variantes são reclassificadas em Variantes Anteriormente Circulantes [51].

Com relação às variantes de SARS-CoV-2, cinco linhagens foram classificadas como VOCs por seu grande impacto epidemiológico e risco à saúde pública global: Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron. De forma geral, as principais mutações adquiridas relatadas foram em relação à proteína S, já que esta proteína é fundamental para a infecção viral. Estas foram relacionadas ao aumento da afinidade de ligação de S a ACE2, alterações na conformação da proteína para favorecer o escape à resposta imune neutralizante e otimização de sítios de

processamento de S para favorecer a infecciosidade do vírus [52]. A mutação D614G foi uma das primeiras a ser identificada em janeiro de 2020 e foi mantida por todas as VOCs que surgiram desde então. A mutação se localiza na região entre as subunidades S1 e S2 de S e está associada à maior estabilidade entre as subunidades, favorecendo a conformação *up* de S e estabilizando a proteína em sua conformação mais acessível para ligação com ACE2. A mutação induziu o aumento da transmissibilidade, infectividade do vírus, replicação e carga viral [53].

A variante Alfa (B.1.1.7) foi detectada em setembro de 2020 no Reino Unido e rapidamente se espalhou pelo mundo todo. Alfa apresentou maior transmissibilidade e severidade da doença em relação ao vírus original. Possui 23 mutações nos genes de S, N e ORF8, dentre elas, 9 se encontram na proteína S: as deleções $\Delta 69-70$ e $\Delta 144$, D614G, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A e D1118H. A mutação N501Y, uma substituição contida no RBD na região de contato direto entre RBM e ACE2, aumentou a afinidade de ligação entre S e ACE2, o que contribuiu diretamente para o aumento da transmissibilidade da variante. Já P681H localiza-se numa região próxima ao sítio de clivagem de furina, um sítio fundamental para infecciosidade do vírus. As deleções H69-V70 estão localizadas na região N-terminal e estão associadas ao escape imune. Por sua vez, a deleção de Y144 causa uma mudança conformacional em NTD que reduz o efeito neutralizante de anticorpos monoclonais sobre esta região [54,55].

A variante Beta (B.1.351) foi detectada em outubro de 2020 na África do Sul e ao final do ano, representava cerca de 90% dos casos reportados no país. Esta variante possui diversas mutações estruturais e não-estruturais, incluindo três substituições cruciais em S: K417N, E484K e N501Y estão localizadas em RBD e foram importantes para o aumento da infectividade viral. K417N foi associada ao aumento da resistência à resposta neutralizante e redução da eficácia vacinal contra ela, assim como a mutação E484K, que também foi implicada no aumento da afinidade de ligação de S e ACE2. Beta foi associada a maior propagação viral e risco de reinfeção, considerada cerca de 50% mais transmissível que variantes anteriores [56].

A variante Gama (P.1) foi detectada em dezembro de 2020 no estado de Manaus. Esta VOC acumula as mesmas mutações principais de Beta, E484K, N501Y e para a posição 417 o aminoácido lisina foi substituído por um resíduo de treonina (K417T). Também contém 5 substituições em NTD, das quais L18F demonstrou reduzir a afinidade de ligação de

anticorpos neutralizantes específicos para este domínio. P.1 também foi associada ao aumento da transmissibilidade, escape da resposta imune e risco de reinfeção [57].

A variante Delta (B.1.167.2), foi isolada na Índia e reportada em março de 2021. Esta foi a primeira variante a incluir as mutações L452R e T478K na proteína S, as quais foram relacionadas a estabilização da interação entre S e ACE2, pois promove alterações estruturais em RBD, o que contribuiu para o aumento da infectividade do vírus [58]. Dentre outras mutações relevantes, a substituição P681R, que também ocorre em Alfa, está situada na região próxima ao sítio de furina, e contribui para a otimização da clivagem deste sítio. Maior virulência e resistência a neutralização também foi associado à Delta, com maior severidade da doença, maior taxa de hospitalização em UTIs, requerimento de oxigênio e maior taxa de óbitos [59].

Ômicron (B.1.1.529) foi classificada em novembro de 2021 como VOC pela OMS. Sua presença foi detectada a princípio na África do Sul, mas logo foi identificada simultaneamente em diversos países. Além de todas as características adquiridas descritas em outras variantes como aumento da transmissibilidade, infecciosidade e escape imune, esta linhagem apresentou grande habilidade de dispersão. Apenas quatro semanas desde os primeiros registros de infecção, esta variante já era responsável por cerca de 60% de novas infecções por SARS-CoV-2 mundialmente [60]. Ainda que Ômicron seja altamente transmissível e capaz de infectar indivíduos convalescentes ou vacinados, estudos indicam que a proteção vacinal ainda é eficiente, mesmo gerando uma resposta neutralizante menor quando comparada a outras variantes [61,62]. Por outro lado, a maioria dos casos de infecção de Ômicron é caracterizada por quadros clínicos assintomáticos ou moderados da doença, e associados a uma menor taxa de hospitalização e fatalidades em relação a outras variantes, o que indica menor virulência desta variante. Uma das razões associadas a isto é o fato desta linhagem

Ômicron conta com 18.621 mutações em seu genoma, sendo 30 destas localizadas no gene de S, entre outras em genes de N, E e M [50,60]. Desde sua emergência, Ômicron tem continuamente evoluído e se expandido em diferentes subvariantes. Atualmente, duas subvariantes de Ômicron, BA.2.86 e JN.1, foram classificadas como VOIs por seu potencial de evasão imune [63].

1.6. Prevenção e diagnóstico

O esforço colaborativo mundial permitiu a rápida criação e aprovação de vacinas no combate a pandemia. Além disso, o conhecimento prévio acerca no campo da vacinologia e de outros coronavírus como SARS e MERS foram fundamentais para o enfrentamento do novo coronavírus. Diversos tipos de estratégias foram adotados, focando na utilização da proteína S e da partícula viral completa, como vacinas de proteína recombinante e vírus inativado, ou ainda de mRNA e vetor viral de adenovírus [64]. A vacina de proteína recombinante SpiN-Tec, é uma tecnologia 100% nacional produzida pelo Centro de Tecnologia de Vacinas (CTVacinas) da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta vacina consiste em uma proteína quimérica que fundiona a porção RBD e a proteína N de SARS-CoV-2 e se encontra em fase de testes clínicos [65].

Atualmente, existem cinco vacinas aprovadas para uso no Brasil sendo elas: de mRNA Cominarty (Pfizer) e Spikevax (Aduin), de vetor adenovírus *Janssen Vaccine* (Janssen) e Oxford/Covishield (Fiocruz/Astrazeneca) e proteína S recombinante Vacina Covid-19 (Zalika). O Programa Nacional de Imunização do Sistema Único de Saúde garante a vacinação em três doses para indivíduos aos 6, 7 e 9 meses de idade [66].

O diagnóstico rápido e precoce é a maneira mais efetiva para o controle da doença, contribuindo para a contenção e prevenindo óbitos. A testagem em massa e isolamento social foram medidas fundamentais para o controle da pandemia e monitoramento do avanço da doença. Para diagnóstico da Covid-19, os métodos de detecção empregados podem se basear na detecção de parte do genoma viral, de antígenos virais ou de anticorpos adquiridos após infecção pelo vírus. A técnica de RT-qPCR é considerada o padrão-ouro para a detecção de infecção por SARS-CoV-2 em sua fase aguda/inicial, por ser altamente específica e sensível [67]. Amostras coletadas por *swab* nasofaríngeal são as mais comumente utilizadas. Realiza-se extração de RNA do material coletado, que é utilizado para subsequente síntese de DNA complementar (cDNA) e amplificação de regiões específicas deste. *Primers* para o gene E, RNA polimerase dependente de RNA, ORF1 e N são os mais utilizados [67,68].

Apesar de ser o método de maior confiança para detecção do vírus, o RT-qPCR possui algumas limitações como: demanda de equipamentos e instalações sofisticados, material com alto custo e profissionais especializados para a execução dos testes, o que pode ser desafiador para regiões com limitações econômicas e logísticas [69]. Além disso, sua aplicação se limita

ao período de replicação do vírus nas vias aéreas superiores, na qual a carga viral atinge seu pico dentro de sete dias após início dos sintomas [70]. Há também o risco de resultados falsos positivos e negativos [68,71,72], o que demonstra a importância do uso de testes complementares para o correto diagnóstico. Outros métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos incluem amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), CRISPR-Cas12 ou Cas13 e sequenciamento de genoma total [68]. O uso combinado de ensaios moleculares e imunológicos contribui para a diminuição de falsos negativos e o risco de exposição de profissionais da saúde durante a coleta de amostras além de auxiliar na tomada de decisão a respeito do diagnóstico [69].

Além disso, há os testes que baseiam na detecção de antígenos virais, dos quais as proteínas S, RBD e N são os mais utilizados. Para esta modalidade de testes diversas tecnologias de detecção são empregadas. O imunoensaio de fluxo lateral é comumente empregado para testes rápidos, no qual o resultado sai em poucos minutos. O sangue do paciente é coletado da ponta do dedo e aplicado sobre um cassete contendo membranas de nitrocelulose. Antígenos conjugados a ouro coloidal imobilizados na membrana capturam os anticorpos presentes na amostra. O complexo antígeno-anticorpo difunde através da membrana e é reconhecido por um anticorpo secundário específico para o anticorpo. O resultado é visualizado como uma linha, indicando a presença de anticorpos contra SARS-CoV-2 na amostra [73]. Estes testes são de fácil manipulação, rápida execução e obtenção dos resultados, além de possuírem alta sensibilidade durante a fase aguda da infecção, devido à alta carga viral nos primeiros dias de infecção, porém em relação ao RT-PCR são considerados menos sensíveis por necessitarem de maior quantidade do vírus para sua performance [73,74]. Técnicas de imunofluorescência e quimioluminescência também são comumente empregadas.

Há ainda os testes que detectam anticorpos específicos contra o vírus, sendo IgA, IgM e IgG, cujas concentrações variam de acordo com o curso da infecção. IgM e IgA são geralmente detectados na primeira semana de infecção, logo, são úteis para determinação de indivíduos infectados. Já o IgG surge em torno da segunda semana de infecção e continua detectável no soro por vários meses, servindo como marcador de indivíduos convalescentes ou vacinados [75]. No entanto, estes testes não são recomendados para diagnóstico da doença, e devem ser complementados por testes moleculares como RT-qPCR. Em áreas onde não há disponibilidade imediata da realização do RT-qPCR no entanto, estes testes são importantes e auxiliam profissionais da saúde na tomada de decisão do diagnóstico [76].

Para além do diagnóstico da COVID-19, os testes sorológicos são importantes ferramentas para estudos epidemiológicos que buscam determinar a prevalência de infecções passadas na população, identificar indivíduos assintomáticos que desenvolveram resposta imunológica, e monitorar a eficácia de vacinas em diferentes contextos populacionais [74].

O ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) é um dos mais utilizados para detecção e quantificação de anticorpos por possuir alta sensibilidade e especificidade. O princípio da técnica se baseia na formação do complexo antígeno-anticorpo, que pode ser quantificado através de reação cromogênica ou fluorescente [73]. Baseado no mesmo princípio de formação de complexo antígeno-anticorpo, os testes quimioluminescentes e eletroquimioluminescentes também são utilizados para detecção.

Visto que a boa parte dos testes utilizados atualmente são importados, a produção de tecnologias nacionais é de fundamental importância para a independência da demanda nacional em relação ao mercado externo. A produção do antígeno é o principal fator encarecedor destes testes, uma vez que as proteínas recombinantes são obtidas em sistema de expressão eucariotos como células de mamífero e inseto. Logo, explorar outros sistemas de expressão que ofereçam um maior custo-benefício como bactérias e leveduras permite o desenvolvimento de testes mais baratos e com produção independente de importação.

1.7. Expressão de proteínas em leveduras

Leveduras são extensamente empregadas nas indústrias de biotecnologia e farmacêutica para produção de biomoléculas para diversas aplicações, especialmente na produção de diferentes antígenos para o desenvolvimento de vacinas. Sua capacidade de crescimento rápido e com alta densidade celular, facilidade de manipulação genética, expressão de proteínas em grandes quantidades, possibilidade de escalonamento da produção e relativo baixo custo associado as torna alternativas atrativas em relação a outros sistemas de expressão eucarióticos como células de mamífero e baculovírus [77].

Komagataella phaffii (anteriormente classificada como *Pichia pastoris*) é uma das espécies mais utilizadas na produção de proteínas recombinantes, além de *Saccharomyces cerevisiae*. *K. phaffii* possui diversas linhagens geneticamente estáveis, com expressão e secreção de proteínas com altos rendimentos e baixa secreção de proteínas endógenas, o que facilita os processos de recuperação e purificação da proteína de interesse. Além disso, é não-

patogênica e é capaz de realizar modificações pós-traducionais, como a adição de glicosilações [78,79]. Diversas proteínas recombinantes já foram produzidas utilizando *K. phaffii* para desenvolvimento de candidatos vacinais e diagnósticos como a proteína NS1 de DENV1-4 [80], o domínio III da proteína do envelope 2 de ZIKV [77], o antígeno de superfície de HBV (HBsAg) para desenvolvimento de vacinas [81,82], α -aglutinina de vírus Influenza A [83], dentre outros [79].

K. phaffii é uma levedura metilotrófica, isto é, utiliza o metanol como fonte de carbono. Seu genoma contém dois genes, *AOX1* e *AOX2*, que codificam enzimas com atividade álcool oxidase. A álcool oxidase é a primeira enzima da via de utilização do metanol e converte metanol em formaldeído com a redução de oxigênio para peróxido de hidrogênio. Estes genes estão sob o controle dos promotores *AOX1* e *AOX2*, respectivamente, nos quais *AOX1* possui maior atividade sendo considerado um promotor mais forte que *AOX2* e pode ser responsável por até 30% das proteínas secretadas pela levedura quando cultivada em metanol. A atividade destes promotores é inibida na presença de outras fontes de carbono com glicose e glicerol. Existem três fenótipos de *K. phaffii* associados ao metabolismo de metanol: *Mut*⁺ (*methanol utilization plus*), o qual contém os dois genes *AOX* ativos. Linhagens com este fenótipo são consideradas selvagens, como GS115 e X-33. *Mut*^s (*methanol utilization slow*) possui um gene *knockout* para *AOX1*, sendo as principais linhagens utilizadas KM71 e KM71H. Quando *AOX1* e *AOX2* não estão presentes, o fenótipo resultante é *Mut*⁻, no qual a levedura não é capaz de metabolizar metanol [84].

A expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii* pode ser facilmente alcançada a partir da substituição do gene *AOX1* controlado pelo promotor *AOX1* pelo gene de interesse em um cassete de expressão, como o vetor pPICZ α A. Aplicando a técnica de transformação, a construção pode ser integrada ao genoma da levedura por recombinação homóloga [85].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir a proteína Domínio de ligação ao receptor (RBD) de SARS-CoV-2 e suas variantes Alfa, Beta e Gama para avaliação como antígeno em teste sorológico para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

2.2. Objetivos Específicos

- Transformar a bactéria *Escherichia coli* com o gene de RBD referente a linhagem selvagem de SARS-CoV-2 e das variantes Alfa, Beta e Gama;
- Transformar a levedura *K. phaffii* KM71H com o gene de RBD referente a linhagem selvagem de SARS-CoV-2 e das variantes Alfa, Beta e Gama;
- Avaliar a produção das RBDs pela levedura *K. phaffii* KM71H;
- Caracterizar as proteínas produzidas por SDS-PAGE e *Western blotting*.
- Confirmar a identidade das proteínas produzidas por espectrometria de massas.
- Avaliar os parâmetros de especificidade e sensibilidade de cada uma das proteínas como antígeno em ensaio sorológico ELISA.

3. ARTIGO

Título: Production of recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain in *Komagataella phaffii* for detection of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies.

*Written under requirements of Diagnostics journal.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has caused unprecedented impact throughout the world, endangering human health and public safety. Although vaccination is already established, the emergence of new variants poses a threat to pandemic control, which calls for continued effort for the development of national technologies useful for surveillance and epidemiological studies, especially in the socioeconomic context of emergent countries. In this regard, our goal was to develop an expression platform using the yeast *K. phaffii* for heterologous expression of the SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) from wild type, Alpha, Beta, and Gamma variants and evaluate their antigenic potential. We obtained purified recombinant RBD at a lab-scale production with reasonable yields (~11 mg/L). RBDs were characterized by western blot and PAS staining. The proteins were evaluated for potential applications such as capturing antigens for indirect ELISA and their ability to discriminate COVID-19 seropositive and seronegative sera samples.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, RBD, *Komagataella phaffii*, ELISA

1. INTRODUCTION

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by the severe acute respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has deeply impacted global public health with over 600 million infection cases and 7 million deaths worldwide [86–88]. Constant effort is needed in the development of new vaccines as new variants continuously arise, especially for emergent countries, where there is an urgent call for national technologies that allow rapid responsiveness to the pandemic. SARS-CoV-2 is a result of a zoonotic event, following the same steps as other members of the *Coronaviridae* family such as SARS-CoV and MERS-CoV [9,46,89]. It is an enveloped virus with a (+) single-stranded RNA genome of ~30 kb, which encodes for 16 non-structural proteins, 4 structural proteins, and 9 accessory proteins. The spike (S) protein is a 1273 amino acid transmembrane glycoprotein located in the viral envelope forming homotrimers [22]. S is responsible for recognition and binding to the human receptor angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) and promoting membrane fusion. It contains two subunits: S1, which is engaged directly in binding to the host receptor, and S2, which possesses a fusion peptide that allows the formation of a pore between viral and cellular membranes and entry of the viral genome into human cells. There are two main domains within S1, the N-terminal domain (NTD) and the C-terminal domain (CTD), which comprises the receptor binding domain, a region that interacts directly with the hACE2 receptor [16]. Since S and RBD are involved in such crucial steps of the viral cycle and contain several important antigenic sites for neutralizing immune response, they are often chosen as antigens for vaccine development [16].

RBD is a 224 amino acid protein domain with a predicted molecular weight of 26 kDa and corresponds to residues 319 to 541 of the S protein sequence. It has two N-glycosylation sites (N331 and N343) and 9 cysteine residues of which 8 of them are involved in disulfide bond formation [36,37]. These post-translational modifications play a fundamental role in S protein maturation as they are directly involved in the correct folding process, stability, and immunogenicity [90,91]. Heterologous expression of RBD therefore would require a eukaryotic system capable of performing those modifications such as reported with mammalian and insect cells. Alternatively, yeasts are also an attractive platform for recombinant protein expression and are extensively used by pharmaceutical and biotechnology industries to produce several biomolecules [79].

Komagataella phaffii, a methylotrophic yeast, is a well-known heterologous platform that allows scalable and cost-effective antigen production. This yeast is capable of using methanol as the sole carbon source. Since methanol metabolism genes are tightly controlled by the AOX1 promoter, genetic manipulation of *K. phaffii* enables recombinant protein expression in the presence of this molecule. Moreover, this yeast can reach high cell densities at rapid growth rates, with high quantities of secreted recombinant protein into the culture medium and low levels of endogenous proteins, which facilitates protein recovery and purification steps. Being a eukaryotic system, *K. phaffii* is also capable of post-translational modifications such as *N*- and *O*-glycosylation. The use of yeasts for subunit vaccine development can be a promising alternative for Low- and Middle-Income Countries (LMICs) to establish a scalable, affordable, and local manufacturing system that can be employed for vaccine production and diagnostic purposes and be promptly distributed to the population [79,92]. RBD has been extensively employed in vaccine and diagnostic development [93–104].

Here we report the expression of RBD from the SARS-CoV-2 original Wuhan strain and three VOCs: Alpha, Beta, and Gamma using *K. phaffii*. We describe a laboratory-scale production of recombinant RBDs that can be adapted to greater proportions. Yeast-derived RBDs were used to capture antigens in an IgG-based ELISA test.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plasmid vectors and strains

The receptor binding domain sequence was retrieved from the SARS-CoV-2 genome (NCBI Reference Sequence: NC_045512.2). The sequence corresponds to amino acid residues 319 to 541 of the spike protein subunit S1. Mutations regarding each variant (Alpha, Beta, and Gamma) were added to the wild-type sequence as described by Choi (2021) [55]. All sequences and amino acids are included in Supplementary Data (Figure S1). Sequences were codon-optimized for yeast expression and inserted into a pPICZ α A vector independently (GenOne, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). The four plasmid constructions were named pPICZ α A-RBD-WT (*wild-type* virus); pPICZ α A-RBD-Alpha (B.1.1.7 variant), pPICZ α A-RBD-Beta (B.1.351 variant), pPICZ α A-RBD-Gamma (P.1 variant). The plasmid pPICZ α A contains a methanol-induced AOX1 promoter, an α -factor secretion signal fused to

it, which encodes a signal peptide that directs expressed protein towards the secretion pathway. A Zeocin™ resistance gene is present as a selection marker and a polyhistidine tag, that adds a six-histidine tail at the C-terminal. The methylotrophic yeast strain *K. phaffii* KM71H was chosen as an expression system. *E. coli* TOP10F was used for plasmid DNA replication and stock using Zeocin™ as selective marker.

2.2. *E. coli* TOP10F cloning

All four constructions were cloned into *E. coli* TOP10F for plasmid replication and stock. Electrocompetent cells (100 µL) were incubated with 200 ng of plasmid DNA in an ice bath for 10 min and transferred to an electroporation cuvette. Electric pulse was applied with the following parameters: 2500 V; 25 µF E 200 Ω, using Eppendorf Eporator®. Immediately after the pulse, cells were mixed into 1 mL of low-salt LB media (Luria-Bertani; 2% peptone, 1% yeast extract, and 1% NaCl) and incubated at 37 °C for 2 h. Cells were plated in agar low-salt LB supplemented with antibiotic Zeocin™ (40 µg/mL) for transformant selection. Plates were incubated at 37 °C for 16 h. Colonies were collected for PCR confirmation and stocked in 20% glycerol at -80 °C.

For cloning confirmation, each colony collected was cultured in 10 mL of low-salt LB with Zeocin™ (40 µg/mL) at 37 °C for 24 h. Plasmid DNA extraction was performed as described by Sambrook (2012) [105]. Briefly, cells were harvested by centrifugation (10 000 rpm, 5 min) and resuspended in 300 µL of Solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 20 µg/mL RNase) and incubated at room temperature for 5 min. Next, 300 µL of Solution II (200 mM NaOH, 1% SDS) was added followed by the addition of 300 µL of Solution III (5M Potassium acetate, 10% acetic acid). The mixture was centrifuged (12 000 rpm, 15 min) and the supernatant was harvested. DNA precipitation was done by adding 500 µL of ice-cold 100% isopropanol followed by incubation at -20 °C for 2 h. After this period, DNA was centrifuged (12 000 rpm, 15 min) and the pellet was washed twice in ice-cold 100% and 70% ethanol, respectively. After drying, DNA was resuspended in 20 µL of sterile deionized water and stocked at -20 °C. DNA concentration was determined by absorbance reading at 280 nm using a NanoDrop 2000 spectrophotometer.

PCR was performed using 300 ng of plasmid DNA, 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 mM forward

and reverse primers, 1,25 U of GoTaq® Polymerase (Promega) and deionized water to make up a 25 µl reaction. Reactions were incubated in a thermocycler (Eppendorf, São Paulo, SP, Brazil) with the following parameters: 94 °C (1 cycle, 2 min), 25 cycles of 94 °C (2 min), 55 °C (1 min e 30 s), 72 °C (1 min e 30 s), 72 °C (1 cycle, 7 min) e 4 °C (undefined time). Primer sequences are listed in Table 1. Two sets of primers were used: RBD-WT specific primers, which target a 446 bp PCR product, and AOX1 primers, which were used for the remaining RBD variants and target a 1210 bp PCR product. Results were visualized via electrophoresis in 1% agarose gel with 0,5% ethidium bromide under ultraviolet light. Bands were compared to a molecular marker (DNA 100 pb and 1 kb Ladders RTU, Kasvi).

Table 1 – Primer sequences for PCR confirmation.

	Forward sequence	Reverse sequence
RBD primer (internal)	5'-GCATCTGTTTACGCC TGGAA-3'	5'-AACCGTAGGACT GTAAGGGG-3'
AOX1 primer (external)	5' GACTGGTTCCAATTG ACAAGC-3'	5'-GGCAATGGCATTCTG ACATCCT-3'

2.3. *K. phaffii* KM71H cloning

Cloning of *K. phaffii* requires linear DNA for genomic integration. To this end, plasmid DNA was linearized with the restriction enzyme SacI (Promega), which cuts specifically to the sequence GAGCTC in the AOX1 promoter. Constructs were linearized independently. To this end, four reactions were performed using 10 µg of plasmid DNA, 1X Reaction Buffer J, 0,1 µg/µL Acetylated BSA, 5 U SacI, and deionized water to make up a 20 µL reaction. Reactions were incubated at 37 °C for 3 h followed by dialysis in 0,025 µm membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for salt removal. DNA was retrieved and stored at -20 °C.

The transformation was performed as described in the EasySelect™ Pichia Expression Kit Manual (Invitrogen, 2010). Linear DNA was added to 80 µL of electrocompetent *K. phaffii* KM71H cells and incubated in ice for 5 min. After, cells were transferred to an electroporation cuvette and pulsed under the same parameters in item 3.2. Immediately after the pulse, 1 mL of 1 M Sorbitol was added to the cells, following incubation at 30 °C for 2 h.

Cells were plated in YPDS agar (1% yeast extract, 2% peptone, 1% D-glucose, 18,2% sorbitol, 2% agar) supplemented with Zeocin® (100 µg/mL) for selection of transformants. Plates were incubated at 30 °C for 72-96 h. Colonies were collected and stored in 20% glycerol at -80 °C.

Genomic DNA was extracted as described in. Briefly, a single colony was cultivated in 5 mL of YPD media (1% yeast extract, 2% peptone, 2% D-glucose) supplemented with Zeocin® (100 µg/mL) at 30 °C, 250 rpm, 24 h. Cells were harvested by centrifugation (12000 rpm, 5 min) and resuspended in an Extraction Buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 8,0, 500 mM EDTA). Glass beads were added, and cells were vortexed for cell wall lysis. The supernatant was retrieved after centrifugation (12000 rpm, 10 min), and added 200 µL of phenol-chloroform-isopropanol solution (50% phenol, 48% chloroform, 2% isopropanol) followed by new centrifugation. The superior phase was collected, 1/10 volume of 5 M potassium acetate and 2 volumes of 100% ethanol, and centrifuged (12000 rpm, 10 min). The pellet was washed in 70% ethanol and dried. DNA was resuspended in 20 µL of deionized water. Confirmation PCR was performed following the same conditions described in item 3.2.

2.4. Expression of recombinant SARS-CoV-2 RBD and Alpha, Beta, and Gamma variants

Protein expression was performed according to the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit Manual (Invitrogen, 2010) [106]. PCR-confirmed transformants were cultured in 25 mL of YPD with Zeocin® (100 µg/mL) at 30 °C, 250 rpm, 24 h. Next, cells were inoculated in 500 mL of BMG media (1,34% yeast nitrogen base, 0,002% biotin, 1% glycerol, 100 mM potassium phosphate, pH 6,0) for biomass increase. The culture was kept under 250 rpm, 30 °C for 72 h, or until OD₆₀₀ reached 2-6, and then centrifuged (3000 g, 10 min) and washed in deionized water for glycerol removal. Cells were inoculated in 200 mL of BMM media (1,34% yeast nitrogen base, 0,002% biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6,0, 1% casamino acids, 2% methanol) for protein expression induction and incubated at 20 °C, 250 rpm for 6 days. Methanol was added to the culture every 24 hours to a final concentration of 2%. The supernatant was harvested by centrifugation (3000 g, 15 min) for protein purification.

2.5. Protein purification

Protein purification was accomplished by affinity chromatography using a HisTrap® Fast Flow Crude 5 mL column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) coupled to the ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Supernatants were filtered in 0,45 µm membranes (Kasvi) and diluted in Binding Buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole). The column was equilibrated in the same buffer and the flow rate was set to 5 mL/min. Protein was recovered with Elution Buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7,4, 500 mM NaCl, 400 mM imidazole). Eluted protein was concentrated in an Amicon ultra-15 centrifugal filter (Merck Millipore) and resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, and 150 mM NaCl.

Protein concentration was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). A standard curve was prepared plotting different BSA concentrations (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL) against their correspondent absorbance reading at 562 nm. Concentration was determined by average absorbance readings of each protein sample applied to the standard curve equation and expressed in µg/mL. Proteins were stored at -80 °C.

2.6. Western blotting

Recombinant RBDs were characterized by Western blotting. Firstly, 20 µg of each protein was subjected to SDS-PAGE and transferred to 0,20 µm nitrocellulose membranes in Tris-Glicine buffer pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) at 4 °C, for 2 h and 200 mA. Next, membranes were incubated in a blocking solution (4% BSA, PBS pH 7,4, 0,05% Tween 20) under constant shaking for 1 h. Membranes were then washed in PBST and incubated independently with either mouse monoclonal poly histidine antibody (Sigma H1029) diluted 1:3000, a pool of 47 human serum samples from SARS-CoV-2 infected patients (FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil) diluted 1:200 or human monoclonal anti-SARS-CoV-2 Spike Protein antibody (ThermoFisher Scientific, MA5-35950) diluted 1:5000 and incubated under constant shaking for 16 h, at room temperature. Secondary antibodies conjugated to peroxidase were added to the membranes (Sigma A4416 and A8792) for 2 h. Bands were revealed with DAB (Sigma) and compared to the molecular marker Precision Plus Dual Color Protein Standards (Bio-Rad).

2.7. Glycosidase assay

To assess the presence of glycosylated forms of recombinant RBDs, an assay was performed with endoglycosidase PNGase F (Sigma), an enzyme capable of removing N-linked oligosaccharides from glycoproteins, under denaturing conditions. Briefly, 20 µg of each protein were incubated with 1% SDS and 50 mM DTT at 95 °C for 10 min for denaturation. Then, PBS pH 7.4, 1% Triton X-100, and 5 U/mL PNGase F were added to the reaction and incubated at 37 °C for 3 h. Removal of glycans was confirmed by SDS-PAGE followed by Western blot using a monoclonal anti-polyhistidine antibody (Sigma H1029). Additionally, glycosylated proteins were detected using periodic acid/Schiff (PAS) staining as described by Xisto (2020) [107].

A second reaction was performed under non-denaturing conditions, so the digested proteins could be used in indirect ELISA. To this end, PNGase F (5 U/mL) was incubated with RBDs in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 150 mM NaCl, and kept at 37 °C for 16 h. Removal of glycans was confirmed by SDS-PAGE.

2.8. Protein sequencing

Recombinant RBDs were processed for identification by mass spectrometry at the Núcleo de Análises de Biomoléculas, UFV. To that end, proteins were prepared for analysis by trypsin digestion as described by Shevchenko (2006) [108]. BSA was used as a positive control. MS1 and MS2 spectra were acquired by Ultraflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). RP-PepMix method was used for MS1 data acquisition, in reflective and positive mode, with a detection range of 500-3400 Da. LIFT method was used for MS2 data acquisition, in positive mode. Data analysis was performed using flexAnalysis, version 3.3 (Bruker Daltonics). MS2 peak lists were generated in mascot generic format (mgf) by the BioTools app, version 3.2.

2.9. Human Serum Samples

In this study, 47 COVID-19 seropositive human serum samples provided by Fundação Oswaldo Cruz in Pernambuco, Brazil (FIOCRUZ-PE) were used. Samples were collected

from April to June 2020 and confirmed as COVID-19 IgG positive by ELISA testing in the facility. Forty-four pre-pandemic human serum samples from our laboratory serum bank from 2018 were used as COVID-19-negative samples. The samples have been previously employed in another study [107]. Samples were heat-inactivated at 56 °C for 30 min before use. All serum samples were kept anonymous.

2.10. Indirect ELISA

Three different assay conditions were used for the optimization of sensibility and specificity parameters. Twenty-four SARS-CoV-2 positive and 23 SARS-CoV-2 negative serum samples were employed. In the first version, purified recombinant RBD-WT was used as coating antigen, diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9,6 at 5 µg/mL, and added (100 µL) to a 96-well ELISA plate (Corning®, Tewksbury, MA). The plate was incubated at 4 °C for 16 h. Next, the plate was washed five times with 300 µL of PBST (0.05% Tween-20 in PBS, pH 7.4) using an automatic plate washer (WellWash™ microplate washer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The plate was blocked with 200 µL of Blocking buffer (3% skim milk in PBST) for 1 h at room temperature (25 °C) followed by another washing round. Serum samples were diluted 1:1000 in Dilution buffer (0.5% skim milk in PBST) and added 100 µL in duplicates to the plate following incubation for 2 h at room temperature. Dilution buffer only was used as a control. After washing, bound antibodies were detected by adding 100 µL of goat anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP, A6029, Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted 1:10000 in Dilution buffer were added to plates and incubated for 1 h at room temperature. HRP substrate 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB) was added to the plates and incubated for 8 min. The reaction was interrupted by adding 1M HCl. Optical density (450 nm) was obtained in a spectrophotometer (MultiskanGo, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

A second assay condition was performed using RBD digested with PNGase F, but all assay parameters such as incubation time, buffers, and antibody dilutions were kept the same as the first assay described above. Finally, the third assay condition employed digested RBD and the addition of 100 mM D-(+)-mannose (Sigma, St. Louis, MO, USA) to Dilution buffer for serum samples and secondary antibody. All remaining assay conditions were kept the same.

2.11. Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software. Receiver operating characteristic (ROC) curves were analyzed to estimate the diagnostic cutoff, sensitivity, and specificity. The unpaired t-test was used to assess the significance of the ELISA assays, a parametric test applied to two independent groups.

3. RESULTS

3.1. Cloning of pPICZ α A-RBD-WT and Alpha, Beta, and Gamma variants

RBD sequences from SARS-CoV-2 wild-type (WT) and Alpha, Beta, and Gamma variants were inserted into a pPICZ α A vector independently (Fig. 1). RBD gene sequence was placed between the AOX1 promoter and transcription terminator (AOX1 TT). The expressed protein is directed to the secretory pathway due to the presence of an α -factor secretion signal (α -factor). A polyhistidine tag (6xHis tag) is also added to the secreted protein. The constructs were cloned into *E. coli* TOP10F (Fig. 2A-D) for plasmid replication and *K. phaffii* (Fig. 3A-D) for protein expression. Insertion of RBD sequences was confirmed by PCR with amplification of 446 bp bands for RBD-WT and 1210 bp bands for Alpha, Beta, and Gamma variants. Positive control reactions contained commercial plasmid and negative control reactions did not contain DNA.

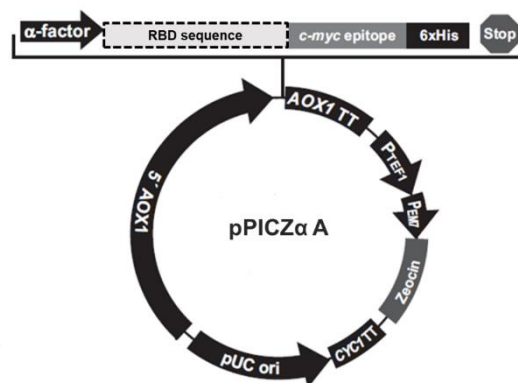


Figure 1 – Map of RBD expression construct for integration into *K. phaffii* genome. The sequence corresponding to SARS-CoV-2 RBD wild-type, Alpha, Beta, and Gamma variants

were inserted independently into a pPICZ α A expression vector resulting in four different plasmids. α -factor: secretion signal; 6xHis tag: polyhistidine tag; 5'AOX1: AOX1 promoter; AOX1 TT: transcription terminator; pUC ori: *E. coli* replication origin site; CYC1TT: bacteria transcription terminator; zeocin: resistance gene; PTEF1 and PEMT promoters, c-myc epitope are not used in this study.

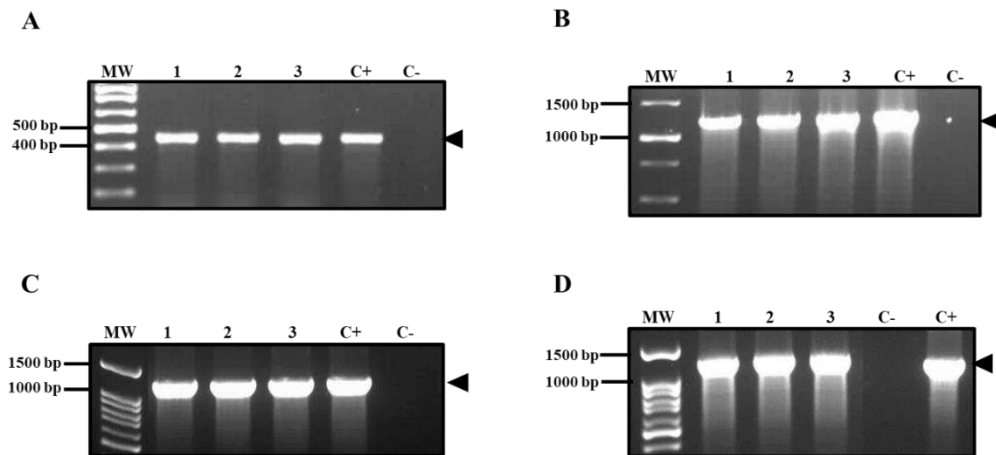


Figure 2 – Confirmation of *E. coli* TOP10F cloning by PCR. Amplification of RBD-WT (A), RBD-Alpha (B), RBD-Beta (C), and RBD-Gamma (D) sequences. Black arrows indicate amplicon of expected size: 446 bp for WT and 1210 bp for Alpha, Beta, and Gamma variants sequences; (1-3): independent transformants; (C+): positive control; (C-): negative control; MW: molecular weight Kasvi 100 bp and 1 kb DNA Ladder RTU.

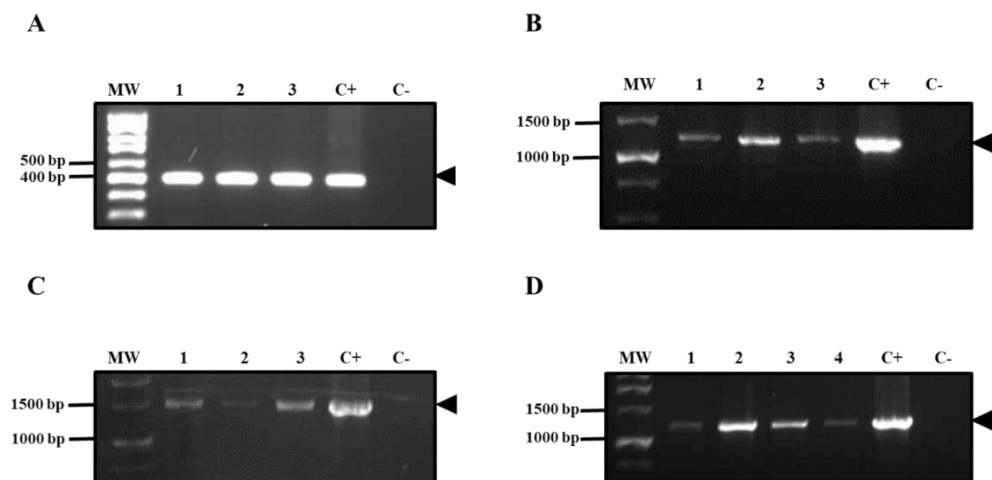


Figure 3 – Confirmation of cloning *K. phaffii* by PCR. Amplification of RBD-WT (A), RBD-Alpha (B), RBD-Beta (C), and RBD-Gamma (D) sequences. Black arrows indicate amplicon of expected size: 446 bp for WT and 1210 bp for Alpha, Beta, and Gamma variants

sequences; (1-4): independent transformants; (C+): positive control; (C-): negative control; MW: molecular weight Kasvi 100 bp and 1 kb DNA Ladder RTU.

3.2. Expression and characterization of recombinant RBDs

Recombinant RBDs had their concentration determined by the BCA kit and production yield calculated (Table 2). The identity of the recombinant RBD proteins was verified by western blot analysis with a poly histidine tag-specific monoclonal antibody and a pool of human sera from SARS-CoV-2 infected patients (Fig. 4). The proteins migrated as a single ~60 kDa protein band on gel, with exception to RBD-Gamma, which had two protein bands marked as 60 and 37 kDa bands indicated by black and white arrows, respectively. The apparent molecular weight of recombinant RBDs (~60 kDa) was higher than the predicted molecular weight (~26 kDa) based on its amino acid sequence, suggesting possible glycosylation and/or aggregation.

Table 2 – Concentrations and production yields of recombinant RBD proteins.

RBD	Concentration* ($\mu\text{g/mL}$)	Yield (mg/L)
WT	2316.33	9.26
Alpha	2126.28	8.50
Beta	1261.67	5.04
Gamma	2814.78	11.26

*Protein concentration determined by standard curve equation $y = 0,009x + 0,1969$; $R^2 = 0,9926$.

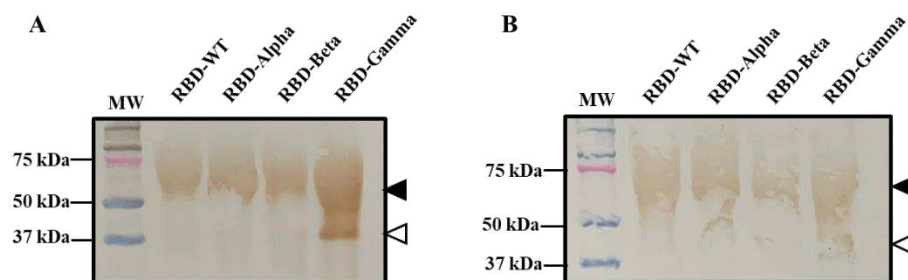


Figure 4 – Western blot analysis of recombinant RBD protein produced in yeast. Proteins were detected with an anti-polyhistidine tag monoclonal antibody (A) and a pool of human sera from SARS-CoV-2 infected patients (B). Black arrows indicate ~60 kDa protein bands and white arrows indicate a ~37 kDa protein band.

Therefore, to investigate this possibility, purified RBD proteins were subjected to treatment with endoglycosidase PNGase F, which cleaves N-linked oligosaccharides from glycoproteins. Migration of non-treated and treated proteins was accessed by SDS-PAGE (Fig. 5A) followed by a western blot analysis with anti-poly histidine tag antibody (Fig. 5B). Additionally, proteins were stained with Schiff's reagent, a staining technique specific for oligosaccharide detection (Fig. 5C). Enzyme-treated RBDs exhibited a similar band pattern with a blurred band at ~50 kDa (black arrow) and two bands at ~35 kDa (white and blue arrows) when subjected to SDS-PAGE. These results indicate that yeast-produced RBDs are glycosylated with N-glycans.

Western blot analysis revealed several bands of lower molecular weight (compared to non-treated RBDs) when RBDs were treated with PNGase F indicating that glycosylation occurs at different levels upon expression in yeast, which generated several protein products with distinct molecular masses. Bands indicated by blue arrows only appear on SDS-PAGE and Western blot analysis indicating a non-glycosylated product from PNGase F reaction. Alternatively, PAS staining indicated that non-treated RBDs are highly glycosylated, and after digestion, only two bands of 50 and ~30 kDa (black and white arrows, respectively) are revealed, suggesting partial digestion of glycoproteins.

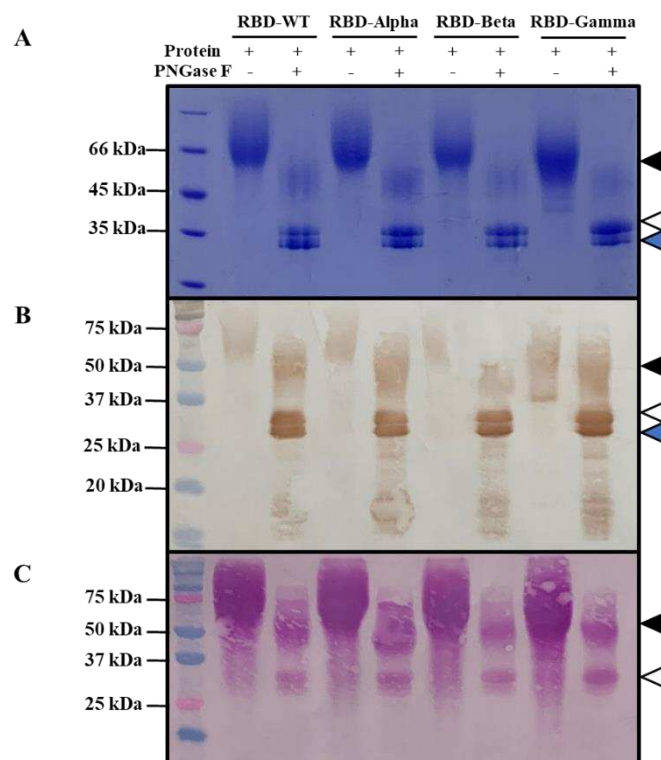


Figure 5 – Digestion of yeast-derived RBD proteins with endoglycosidase PNGase F. (A) 12% SDS-PAGE of non-treated and treated proteins. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by western blot (B) and PAS staining (C). Non-treated protein bands are indicated by black arrows, and digested proteins are indicated by white and blue arrows. Symbol (+) indicates presence; (-) indicates absence.

Digested and undigested RBDs were also subjected to western blot using a pool of SARS-CoV-2 positive human serum samples (Fig. 6A) and anti-SARS-CoV-2 Spike Protein primary antibody (Fig. 6B). Serum samples could detect both glycosylated and deglycosylated forms of RBD, whereas anti-Spike protein could only detect deglycosylated proteins.

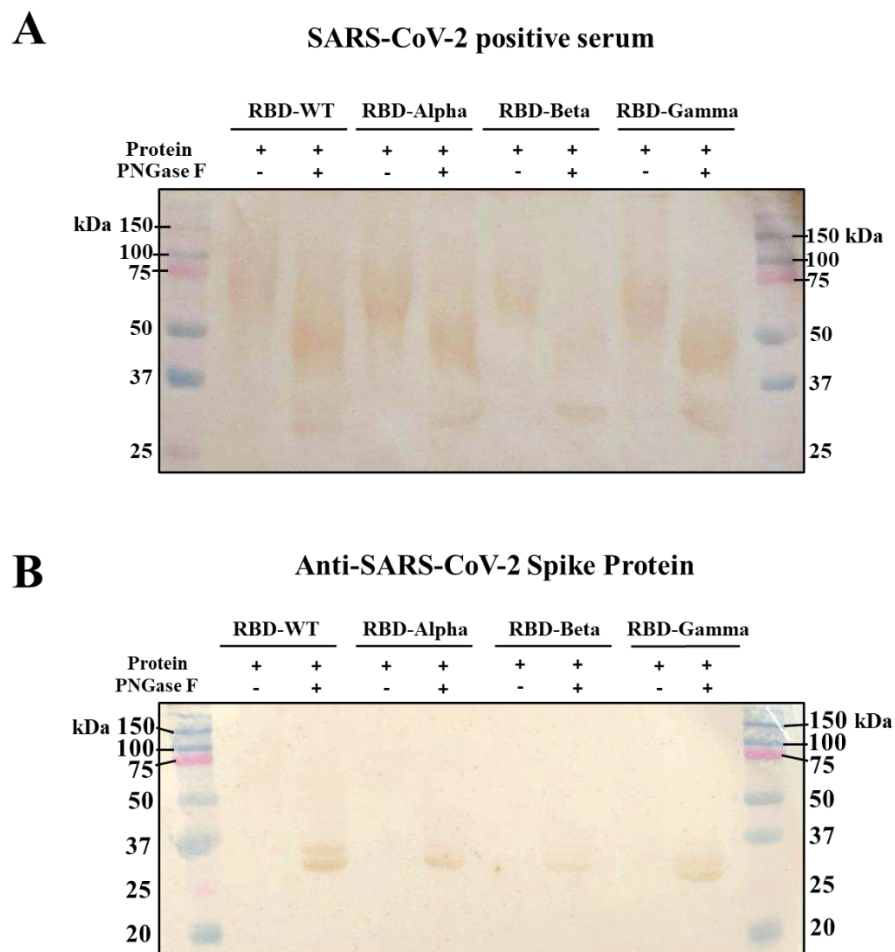


Figure 6 – Western blot of RBDs digested with PNGase F under denaturing conditions. Non-treated proteins were used as controls. Proteins were detected using mouse monoclonal anti-

SARS-CoV-2 Spike Protein antibody and rabbit anti-Human IgG conjugated to HRP (secondary antibody). Symbol (+) indicates presence; (-) indicates absence.

RBDs were also digested with PNGase F under non-denaturing conditions to conserve structural epitopes and be further used in indirect ELISA. PNGase F reaction efficiency was assessed by SDS-PAGE (Fig. 7). Treated proteins under non-denaturing conditions exhibited a similar pattern compared to denaturing conditions as described above (Fig. 5B).

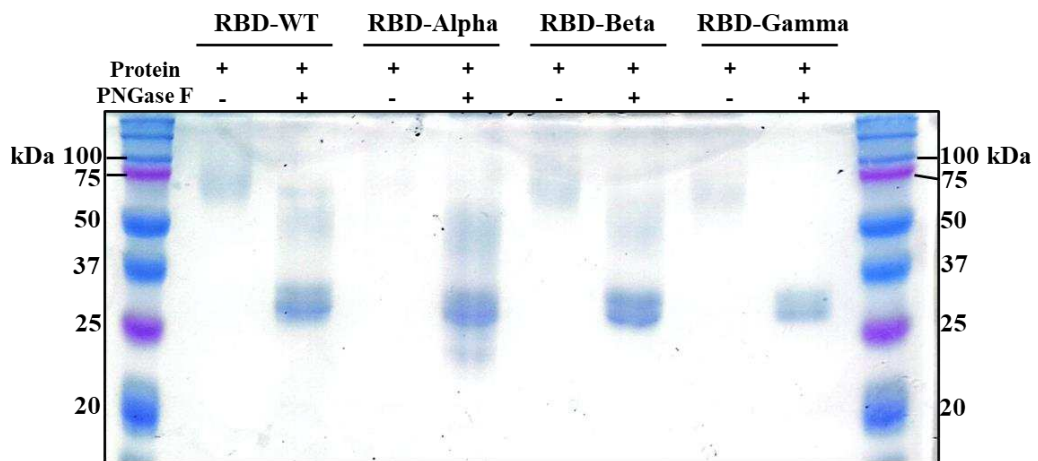


Figure 7 – Digestion of RBD proteins with endoglycosidase PNGase F. Proteins (20 μ g) were incubated with PNGase F for 16 h at 37 $^{\circ}$ C under non-denaturing conditions. Reaction efficiency was assessed by 12% SDS-PAGE. Symbol (+) indicates presence and (-) indicates absence.

3.3. Protein sequencing

The identity of recombinant RBDs was confirmed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (Table 3). Bovine serum albumin was used as a positive control.

Table 3 – Identification of recombinant RBDs and BSA by MALDI-TOF/TOF using MASCOT online algorithm.

Sample	Protein	Organism	Database	Access number	Identification score (MS/MS) (1)	Sequence coverage	Theoretical		NIP (2)	Peptide sequence	Prob. (3)	m/z
							Molecular mass	Isoelectric point				
BSA	Albumin	<i>Bos taurus</i>	Mammalia	P02769	75	6%	71244	5.82	3	DAFLGSFLYEYSR	49	1567,70
			/	ALBU_BOVI						RHPEYAVSVLLR	55	1439,78
										LGEYGFQNALIVR	34	1479,75
WT	Spike glycoprotein	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>	SARS-CoV-2	P0DTC2	107	3%	143.369	6.24	4	FASVYAWN	50	1113,55
			UNIPROT	2						LNDLCFTNVYAD	23	2046,99
										VGGNYNYLYR	51	1218,60
										SNLKPFER	22	990,53
P1	Spike glycoprotein	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>	SARS-CoV-2	P0DTC2	126	2%	143.369	6.24	3	FASVYAWN	56	1113,52
			UNIPROT	2						VGGNYNYLYR	73	1218,56
										SNLKPFER	23	990,50
B117	Spike glycoprotein	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>	SARS-CoV-2	P0DTC2	225	3%	143.369	6.24	4	FASVYAWN	72	1113,52
			UNIPROT	2						LNDLCFTNVYAD	115	2046,94
										VGGNYNYLYR	55	1218,55
										SNLKPFER	21	990,51
B1351	Spike glycoprotein	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>	SARS-CoV-2	P0DTC2	153	2%	143.369	6.24	3	FASVYAWN	58	1113,54
			UNIPROT	2						VGGNYNYLYR	72	1218,58
										SNLKPFER	49	990,52

(1) Total identification score: MS/MS (MASCOT); (2) Number of identified peptides; (3) Identification score of each fragment originated from MS/MS analysis.

3.4. Indirect ELISA

Data regarding ELISA optimization is presented below. In the optimization phase, we employed 24 SARS-CoV-2 IgG positive and 23 negative serum samples. The first assay condition (Fig. 8A) using glycosylated RBD resulted in 65.22% sensibility, 58.33% specificity, and a cutoff value of 0.3207 with no statistical significance between positive and negative sera. The second assay condition (Fig. 8B), which employed deglycosylated RBD presented higher values of such parameters (66.67% sensibility, 62.50 specificity, and cutoff of 0.3462), although not statistically significant. The third assay condition (Fig. 8C) had 73.91% sensitivity and 75% specificity, with a cutoff of 0.1130 and statistical significance. These values were the highest obtained among the three conditions tested.

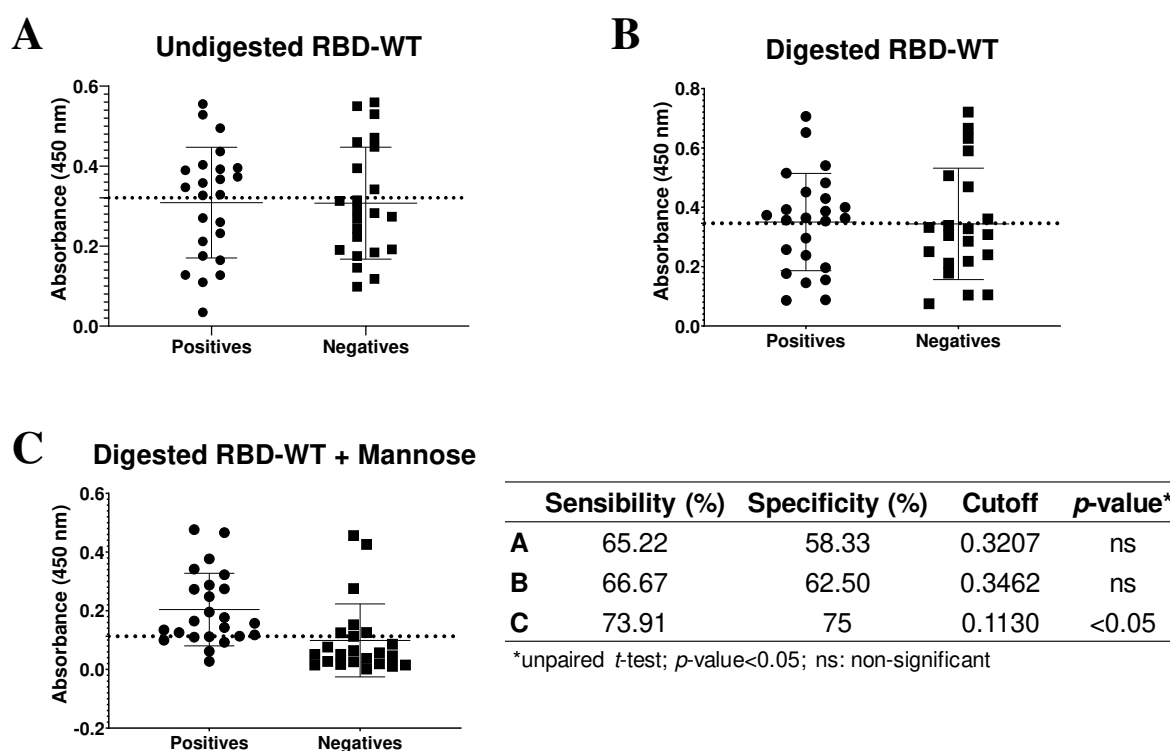


Figure 8 – Optimization of indirect ELISA conditions. Three assay conditions were tested to improve the sensibility and specificity parameters of the test. **A)** Purified RBD-WT was used as a coating antigen (5 μ g/mL). **B)** Purified RBDs were digested with PNGase F under non-denaturing conditions and used as coating antigens. **C)** Digested RBD-WT was used as coating antigen and 100 mM D-(+)-mannose was added to the dilution buffer of serum samples and secondary antibody. Sensibility (%), specificity (%), and cutoff values were

obtained from ROC curve analysis. Dashed lines represent cutoff values for each test. An unpaired *t*-test was performed to assess statistical significance; * $p < 0.05$.

Since the third assay condition provided the highest values for ELISA parameters, a new assay was performed using the entirety of serum samples (47 SARS-CoV-2 positive and 44 SARS-CoV-2 negative samples) and all four recombinant RBDs (Fig. 9). Sensibility, specificity, and cutoff values obtained from ROC curve analysis are listed in Table 4. Wild-type RBD had the highest sensibility and specificity values among all proteins, 76.09% and 77.27%, respectively, and a cutoff of 0.1160. RBDs from Alpha, Beta, and Gamma variants displayed lower percentages. Alpha RBD had a 52.27% sensibility and 59.57% specificity with a cutoff of 0.0557. Beta RBD had a 61.36% sensibility and 64.44% specificity, with a cutoff of 0.3584. Lastly, Gamma RBD had 55% sensibility and 74.47% specificity, and a cutoff of 0.00769.

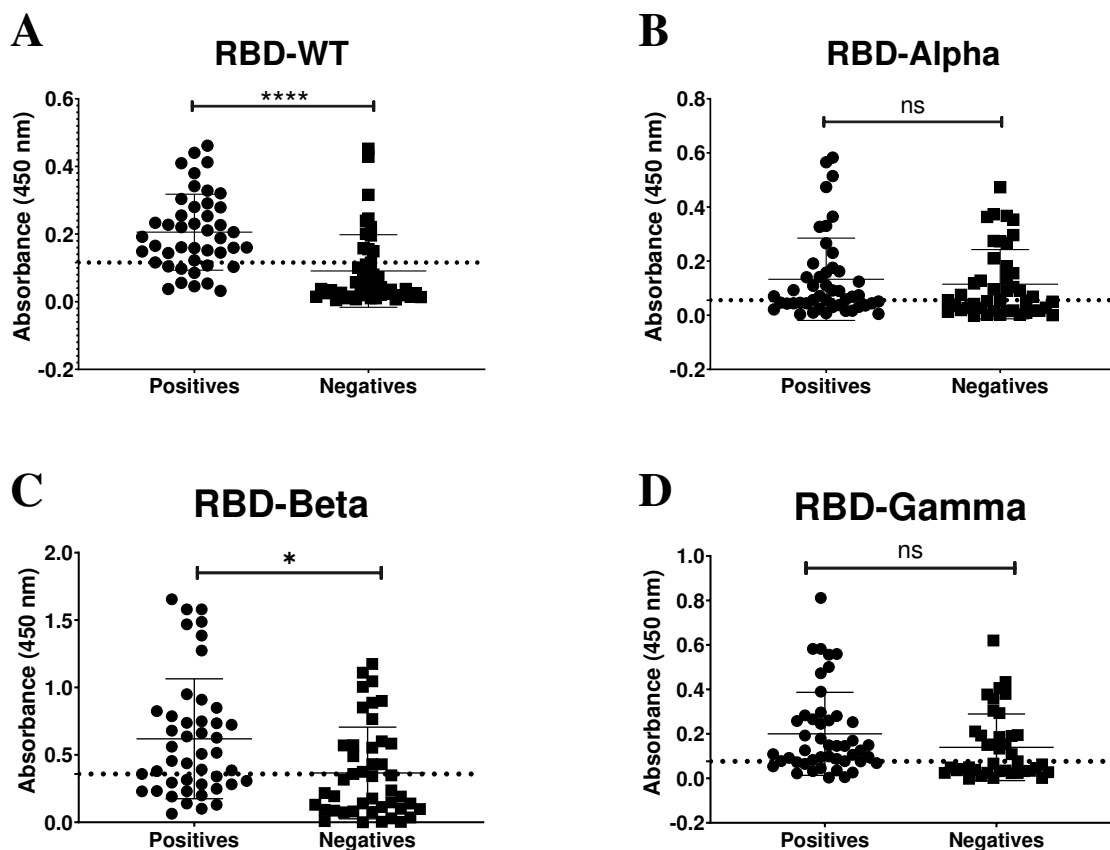


Figure 9 – Anti-SARS-CoV-2 IgG indirect ELISA using four RBD protein variants: Wild-type (A), Alpha (B), Beta (C), and Gamma (D). **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; ns: non-significant.

Table 4 – Sensibility (%), specificity (%), and cutoff values of anti-SARS-CoV-2 IgG indirect ELISA.

Protein	Sensibility (%)	Specificity (%)	Cutoff	p-value*
Wild type	76.09	77.27	0.1160	<0.001
Alpha	52.27	59.57	0.0557	ns
Beta	61.36	64.44	0.3584	<0.05
Gamma	55	74.47	0.0769	ns

*Unpaired *t*-test; ns: non-significant.

4. DISCUSSION

The receptor binding domain of the SARS-CoV-2 S protein is an essential component for virus entry in human host cells, by directly interacting with the ACE2 receptor. Moreover, RBD contains epitopes that induce a potent neutralizing response, serving as an important target in vaccine development against SARS-CoV-2 [36]. In this study, we have successfully expressed recombinant RBDs from four relevant SARS-CoV-2 variants using yeast *K. phaffii* as an expression system. RBD sequence was cloned into an integrative vector pPICZ α A with expression induced by methanol. This yeast strain has been extensively employed in protein production for pharmaceutical and therapeutic purposes due to its capacity high levels of secreted protein and ease of scale-up at low cost [79].

The supernatant of yeast culture was purified by nickel-affinity chromatography and concentrated in ultracentrifuge filters for removal of imidazole and buffer exchange. The final yield of RBD production was expressed in milligrams of protein per liter of culture. The expression of recombinant RBDs in *K. phaffii* yielded significant quantities of protein, ranging from 5 to 11 mg/L, considering a laboratory scale. Our results are comparable to other studies that used small-scale production [109]. This could be further improved with optimized fermentation conditions, in which yield can reach up to 200 mg/L as described by [110,111].

Western blot analysis revealed that yeast produced RBD proteins presented higher molecular weight than expected based on the RBD amino acid sequence, ~26 kDa. Since *K. phaffii* is known for adding post-translational modifications to expressed proteins such as glycosylation, we hypothesized that our recombinant RBDs were secreted under glycoforms.

he SARS-CoV-2 spike protein is prone to glycosylation as it possesses several sites. For instance, 22 sites were predicted for N-linked glycans and 5 were predicted for O-linked glycans for spike protein subunits S1 and S2 [112–114]. Out of those, RBD contains 2 predicted N-glycosylation sites at 331 and 344 amino acid positions, and 2 predicted sites for O-linked glycans at 323 and 325 amino acid positions, all confirmed by Shajahan (2020) [115]. Our recombinant RBD variants also contained these mentioned sites for N and O-glycosylation [116]. The addition of oligosaccharides to proteins can elevate their final molecular weight as indicated by several studies related to yeast-derived recombinant RBDs. Glycosylation is confirmed upon treatment with an endoglycosidase such as PNGase F or Endo H [111,117,118]. Although we did not evaluate the glycosylation types present in our samples, we reasoned that high-mannose glycans would be predominant, since these are the most common type of N-glycans for *K. phaffii* [119]. Besides yeast cells, RBD expressed in Sf9 insect cells also displayed higher molecular size due to glycosylation [120].

In this study, purified recombinant RBD migrated as a single smear band at ~60 kDa, most likely due to the addition of high molecular weight oligosaccharides to the proteins. Similar results were described by Zang et al (2021) [111], as yeast-produced monomeric RBDs appeared as ~50 kDa bands and returned to the expected molecular weight after digestion with PNGase F. Interestingly, the authors also reported that digestion of dimeric RBDs can result in different sized products. Western blot analysis of digested dimeric RBDs revealed reaction products of ~50 kDa and double bands of ~30 kDa, like what was observed in this study, suggesting that our RBDs can self-associate into oligomers. Since SARS-CoV-2 spike protein assembles as trimers in the viral envelope and contains various multimerization domains, including in the receptor binding motif within RBD, it is reasonable to expect that RBD could self-associate in solution and generate higher molecular size products than its predicted mass [121]. Dalvie and others (2021) [110] have also addressed this point in their work, in which the formation of high molecular size aggregates was observed in yeast produced RBDs. Aggregation is related to cross-linking between two or more protein molecules. Since the RBD sequence contains 9 cysteine residues and could form four disulfide bonds, one cysteine residue (C538 in RBD amino acid sequence) would be available for potential intramolecular binding which can lead to the formation of aggregates and reduce protein yields. This issue can be overcome by substitution of the cysteine residue with another amino acid, such as alanine, as described by Pollet (2021) and Chen (2020) [122,123]

The presence of double bands when yeast-derived proteins are subjected to electrophoresis is not unusual. The phenomenon has been described by Wang and others (2020) [124], in which a glycoengineered expression system was developed using *K. phaffii*. Arbeitman and collaborators (2020) [109] also observed double bands of similar molecular size after PNGase F treatment of mammalian and yeast derived RBDs. Moreover, this is not limited only to SARS-CoV-2 proteins, for instance, Xisto et al., (2020) [107] reported similar results when DENV NS1 protein produced by *K. phaffii* is subjected to western blot and PAS staining, in which a higher band corresponded to a glycoform of NS1, and a lower band corresponded to non-glycosylated NS1. Therefore, our results suggest the presence of glycosylated and non-glycosylated forms of recombinant RBDs as double bands at ~35 kDa, along with a glycoform of ~50 kDa, after treatment with PNGase F since both bands are detected by western blot and only one is marked by PAS staining. Deletion of asparagine residue (N331), an N-glycosylation site, of the RBD sequence, could be employed to reduce hyper-glycosylated protein forms during yeast expression and improve production yields [123,125]. Furthermore, the identity of recombinant RBDs was confirmed by mass spectrometry. The sequences identified are in accordance with previous reports [126].

Different assay conditions for indirect ELISA were tested since employing only purified RBD as coating antigen resulted in low sensibility and specificity values (65.22 and 58.33%, respectively). A previous study showed that RBD treated with an endoglycosidase, Endo H, performed better in ELISA tests than its native, glycosylated form [127]. In this study, RBD also expressed in *K. phaffii* was able to discriminate 83.3% of SARS-CoV-2 positive human serum samples in indirect ELISA. Although glycosylation plays an important role in protein biological function, mannose residues could be physically impairing antibody access to epitopes. Moreover, the western blot analysis with a specific anti-Spike Protein antibody could only detect RBD after treatment with PNGase F. Therefore, this strategy was employed to improve detection in ELISA. In this second assay condition, sensibility and specificity from ROC curve analysis slightly increased to 66.67 and 62.50%, respectively, however, these values were still lower than desired for a diagnostic test. A third strategy was used to improve these parameters, D- (+)-mannose was added to the dilution buffer of serum samples and secondary antibody. Since mannose is a common component of yeast cell walls and it is also a -pathogen-associated molecular pattern (PAMP) [128], it was hypothesized that any anti-mannose antibodies present in the serum samples could potentially interfere with the test, causing unspecific interactions. In this setting, sensibility was 73.91% and

specificity was 75%. In the subsequent ELISAs, mannose was included as well as previously treated RBDs.

The four RBD variants were employed in ELISA to verify their capacity discriminate between positive and negative serum samples. Among them, only two had statistically significant results (wild-type and Beta variants). The highest sensitivity and specificity values were obtained when using wild-type RBD, while these parameters significantly decreased for other variants. The values obtained from wild-type RBD were relatively low when compared to other similar studies. An RBD-based IgG ELISA developed by Mehdi *et al* [97], obtained high specificity (99.79%) using sera from SARS-CoV-2 RT-PCR positive individuals. Moreover, they have observed that sensitivity increased in samples collected more than 14 days of symptoms onwards, as they reported 80.47% sensitivity for sera collected between 14-20 days of symptoms and 88.24% for sera collected between 21-27 days. They also observed that in the 21-27 days group sensitivity increased to 92.14%, the highest value obtained [97].

Raoufi and others [100] have developed a highly specific and sensitive IgG serologic test using *K. phaffii*-expressed RBD. The authors provided the basis for obtaining high yields of the recombinant protein in a scaled-up production using 10 L fermenters. IgG indirect ELISA had an average of 91.2% sensitivity and 100% specificity [100]. However, in this study, the authors did not verify the glycosylation status of the recombinant protein, and employed it in ELISA after purification, most likely in its native glycosylated form.

Alternatively, a comparative study by Cota and others [129], in which different commercial diagnostic kits available in Brazil were tested, has found that sensitivity from IgG ELISA tests ranged from 58.7% to 76.8%. It must be noted that some commercial kits provided better performance given certain circumstances. In COVID-19 diagnosis, days of symptoms and clinical severity influence a test's discriminating power [97,129]. As pointed out in the study by Cota, in which six commercial ELISA kits were tested, the sensitivity and specificity increased in confirmed cases with more than 14 days of symptoms. For these samples, sensitivity ranged from 78.9 to 93.2%. In our study, it should be considered that we used samples collected at various time points (days after symptom onset) which could affect the test sensitivity. Furthermore, the authors reported that the presence of acute respiratory distress syndrome (ARDS), a severe clinical outcome of SARS-CoV-2 infection, also

affected the test performance, as cases with ARDS presented higher sensitivity values than cases without ARDS [129].

The different results in ELISA among variants could be related to the time that serum samples were collected. Since they were obtained in the year 2020, some of the variants were not present in Brazilian territory such as Alpha and Beta, or did not exist, such as Gamma [130]. Employing a larger panel of samples collected at the different time points of the pandemic could provide a more comprehensive assessment of the efficiency of RBDs from variants Alpha, Beta, and Gamma in serological testing. In a recent study, Schwarze and others [131] reported that RBD from alpha, beta, gamma, and omicron variants had decreased sensitivity and specificity values compared to wild type. This correlates to the accumulation of new mutations in the S protein and RBD region that can affect IgG recognition, a strategy for escaping immune responses acquired from previous infections [131].

Pre-pandemic sera samples were used as SARS-CoV-2 negative samples for our tests. These samples have been previously employed in Dengue IgG ELISA. It is worth mentioning that several studies have discussed whether antibodies against other infectious diseases such as arboviruses and other coronaviruses could potentially cause false positives, compromising their specificity [132,133]. Specifically for Dengue, there is controversy around this topic, since there are studies indicating cross-reaction between anti-Dengue immune sera and SARS-CoV-2 Spike protein. Opposed to this, other studies have reported a low risk of serological cross-reactivity between Dengue and SARS-CoV-2 IgG antibodies [134–137]. Furthermore, other unknown unspecific interactions could be contributing to the results obtained.

5. CONCLUSIONS

In this study, recombinant RBD from wild type and other three SARS-CoV-2 variants were expressed in yeast *K. phaffii* and evaluated for their potential use in serological testing. Results obtained in IgG ELISA indicated similar assay parameters compared to commercial kits. However, other studies have reported higher sensibility and specificity values using recombinant RBD. Nevertheless, the knowledge gathered can provide the basis for further modifications to test conditions to improve results. This study highlights the complexity of developing serological assays as many factors can impact the outcome. Fundamental for

diagnosis especially in low to medium-income countries, ELISA is also an essential tool in epidemiological surveillance, vaccine development assessment, and public health decision-making.

6. REFERENCES

1. Lu, H.; Stratton, C.W.; Tang, Y.W. Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan, China: The Mystery and the Miracle. *J Med Virol* **2020**, *92*, 401, doi:10.1002/JMV.25678.
2. Organization, W.H. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19-11 March 2020 2020.
3. World Health Organization WHO Covid-19 Data Dashboard.
4. Ellwanger, J.H.; Chies, J.A.B. Zoonotic Spillover: Understanding Basic Aspects for Better Prevention. *Genet Mol Biol* **2021**, *44*, 20200355, doi:10.1590/1678-4685-GMB-2020-0355.
5. Lytras, S.; Xia, W.; Hughes, J.; Jiang, X.; Robertson, D.L. The Animal Origin of SARS-CoV-2. *Science (1979)* **2021**, *373*, 968–970, doi:10.1126/SCIENCE.ABH0117/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABH0117_TABLE_S1.CSV.
6. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 141, doi:10.1038/S41579-020-00459-7.
7. Holmes, E.C.; Goldstein, S.A.; Rasmussen, A.L.; Robertson, D.L.; Crits-Christoph, A.; Wertheim, J.O.; Anthony, S.J.; Barclay, W.S.; Boni, M.F.; Doherty, P.C.; et al. The Origins of SARS-CoV-2: A Critical Review. *Cell* **2021**, *184*, 4848–4856, doi:10.1016/J.CELL.2021.08.017.
8. Organization, W.H. WHO-Convended Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part. **2021**.
9. Ellwanger, J.H.; Chies, J.A.B. Zoonotic Spillover: Understanding Basic Aspects for Better Prevention. *Genet Mol Biol* **2021**, *44*, 20200355, doi:10.1590/1678-4685-GMB-2020-0355.
10. Gorbalenya, A.E.; Baker, S.C.; Baric, R.S.; de Groot, R.J.; Drosten, C.; Gulyaeva, A.A.; Haagmans, B.L.; Lauber, C.; Leontovich, A.M.; Neuman, B.W.; et al. The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 536–544, doi:10.1038/s41564-020-0695-z.
11. Woo, P.C.Y.; de Groot, R.J.; Haagmans, B.; Lau, S.K.P.; Neuman, B.W.; Perlman, S.; Sola, I.; van der Hoek, L.; Wong, A.C.P.; Yeh, S.-H. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *Journal of general virology* **2023**, *104*, 001843.
12. Arya, R.; Kumari, S.; Pandey, B.; Mistry, H.; Bihani, S.C.; Das, A.; Prashar, V.; Gupta, G.D.; Panicker, L.; Kumar, M. Structural Insights into SARS-CoV-2 Proteins., doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024.
13. Thoms, M.; Buschauer, R.; Ameisemeier, M.; Koepke, L.; Denk, T.; Hirschenberger, M.; Kratzat, H.; Hayn, M.; MacKens-Kiani, T.; Cheng, J.; et al. Structural Basis for Translational Shutdown and Immune Evasion by the Nsp1

- Protein of SARS-CoV-2. *Science* **2020**, *369*, 1249–1256, doi:10.1126/SCIENCE.ABC8665.
14. Bai, C.; Zhong, Q.; Fu Gao, G. Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins. **2022**, *65*, 280–294, doi:10.1007/s11427-021-1964-4.
 15. Xu, Z.; Choi, J.H.; Dai, D.L.; Luo, J.; Ladak, R.J.; Li, Q.; Wang, Y.; Zhang, C.; Wiebe, S.; Liu, A.C.H.; et al. SARS-CoV-2 Impairs Interferon Production via NSP2-Induced Repression of mRNA Translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119*, doi:10.1073/PNAS.2204539119/-/DCSUPPLEMENTAL.
 16. Bai, C.; Zhong, Q.; Fu Gao, G. Overview of SARS-CoV-2 Genome-Encoded Proteins. **2022**, *65*, 280–294, doi:10.1007/s11427-021-1964-4.
 17. Ricciardi, S.; Guarino, A.M.; Giaquinto, L.; Polishchuk, E. V.; Santoro, M.; Di Tullio, G.; Wilson, C.; Panariello, F.; Soares, V.C.; Dias, S.S.G.; et al. The Role of NSP6 in the Biogenesis of the SARS-CoV-2 Replication Organelle. *Nature* **2022** *606:7915* **2022**, *606*, 761–768, doi:10.1038/s41586-022-04835-6.
 18. Yan, F.; Gao, F. An Overview of Potential Inhibitors Targeting Non-Structural Proteins 3 (PLpro and Mac1) and 5 (3CLpro/Mpro) of SARS-CoV-2. *Comput Struct Biotechnol J* **2021**, *19*, 4868, doi:10.1016/J.CSBJ.2021.08.036.
 19. Ricciardi, S.; Guarino, A.M.; Giaquinto, L.; Polishchuk, E. V.; Santoro, M.; Di Tullio, G.; Wilson, C.; Panariello, F.; Soares, V.C.; Dias, S.S.G.; et al. The Role of NSP6 in the Biogenesis of the SARS-CoV-2 Replication Organelle. *Nature* **2022** *606:7915* **2022**, *606*, 761–768, doi:10.1038/s41586-022-04835-6.
 20. Slanina, H.; Madhugiri, R.; Bylapudi, G.; Schultheiß, K.; Karl, N.; Gulyaeva, A.; Gorbalenya, A.E.; Linne, U.; Ziebuhr, J. Coronavirus Replication-Transcription Complex: Vital and Selective NMPylation of a Conserved Site in Nsp9 by the NiRAN-RdRp Subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2022310118, doi:10.1073/PNAS.2022310118/SUPPL_FILE/PNAS.2022310118.SAPP.PDF.
 21. Romano, M.; Ruggiero, A.; Squeglia, F.; Maga, G.; Berisio, R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/CELLS9051267.
 22. Arya, R.; Kumari, S.; Pandey, B.; Mistry, H.; Bihani, S.C.; Das, A.; Prashar, V.; Gupta, G.D.; Panicker, L.; Kumar, M. Structural Insights into SARS-CoV-2 Proteins., doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024.
 23. Romano, M.; Ruggiero, A.; Squeglia, F.; Maga, G.; Berisio, R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/CELLS9051267.
 24. Sun, Y.; Ke, H.; Han, M.; Chen, N.; Fang, W.; Yoo, D. Nonstructural Protein 11 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Suppresses Both MAVS and RIG-I Expression as One of the Mechanisms to Antagonize Type I Interferon Production. *PLoS One* **2016**, *11*, e0168314.
 25. Gadhav, K.; Kumar, P.; Kumar, A.; Bhardwaj, T.; Garg, N.; Giri, R. Conformational Dynamics of 13 Amino Acids Long NSP11 of SARS-CoV-2

- under Membrane Mimetics and Different Solvent Conditions. *Microb Pathog* **2021**, *158*, 105041.
26. Redondo, N.; Zaldívar-López, S.; Garrido, J.J.; Montoya, M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol* **2021**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.708264.
 27. Bai, Z.; Cao, Y.; Liu, W.; Li, J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses* **2021**, *13*, doi:10.3390/V13061115.
 28. Neuman, B.W.; Buchmeier, M.J. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. *Adv Virus Res* **2016**, *96*, 1–27, doi:10.1016/BS.AIVIR.2016.08.005.
 29. Fu, Y.Z.; Wang, S.Y.; Zheng, Z.Q.; Yi Huang; Li, W.W.; Xu, Z.S.; Wang, Y.Y. SARS-CoV-2 Membrane Glycoprotein M Antagonizes the MAVS-Mediated Innate Antiviral Response. *Cell Mol Immunol* **2021**, *18*, 613, doi:10.1038/S41423-020-00571-X.
 30. Kuzmin, A.; Orekhov, P.; Astashkin, R.; Gordeliy, V.; Gushchin, I. Structure and Dynamics of the SARS-CoV-2 Envelope Protein Monomer. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2022**, *90*, 1102–1114.
 31. Boson, B.; Legros, V.; Zhou, B.; Siret, E.; Mathieu, C.; Cosset, F.L.; Lavillette, D.; Denolly, S. The SARS-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins Modulate Maturation and Retention of the Spike Protein, Allowing Assembly of Virus-like Particles. *Journal of Biological Chemistry* **2021**, *296*, 100111, doi:10.1074/JBC.RA120.016175.
 32. Zheng, M.; Karki, R.; Williams, E.P.; Yang, D.; Fitzpatrick, E.; Vogel, P.; Jonsson, C.B.; Kanneganti, T.D. TLR2 Senses the SARS-CoV-2 Envelope Protein to Produce Inflammatory Cytokines. *Nat Immunol* **2021**, *22*, 829–838, doi:10.1038/S41590-021-00937-X.
 33. Xia, B.; Shen, X.; He, Y.; Pan, X.; Liu, F.L.; Wang, Y.; Yang, F.; Fang, S.; Wu, Y.; Duan, Z.; et al. SARS-CoV-2 Envelope Protein Causes Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)-like Pathological Damages and Constitutes an Antiviral Target. *Cell Res* **2021**, *31*, 847–860, doi:10.1038/S41422-021-00519-4.
 34. Jackson, C.B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2021 23:1* **2021**, *23*, 3–20, doi:10.1038/s41580-021-00418-x.
 35. Mistry, P.; Barmania, F.; Mellet, J.; Peta, K.; Strydom, A.; Viljoen, I.M.; James, W.; Gordon, S.; Pepper, M.S. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* **2022**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.809244.
 36. Jackson, C.B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2021 23:1* **2021**, *23*, 3–20, doi:10.1038/s41580-021-00418-x.

37. Mistry, P.; Barmania, F.; Mellet, J.; Peta, K.; Strydom, A.; Viljoen, I.M.; James, W.; Gordon, S.; Pepper, M.S. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* **2022**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.809244.
38. Grant, O.C.; Montgomery, D.; Ito, K.; Woods, R.J. Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein Glycan Shield: Implications for Immune Recognition. *bioRxiv* 2020.
39. Casalino, L.; Gaieb, Z.; Goldsmith, J.A.; Hjorth, C.K.; Dommer, A.C.; Harbison, A.M.; Fogarty, C.A.; Barros, E.P.; Taylor, B.C.; McLellan, J.S.; et al. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci* **2020**, *6*, 1722–1734, doi:10.1021/acscentsci.0c01056.
40. Harrison, A.G.; Lin, T.; Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* **2020**, *41*, 1100–1115, doi:10.1016/J.IT.2020.10.004.
41. Meselson, M. Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 2063–2063, doi:10.1056/NEJMC2009324/SUPPL_FILE/NEJMC2009324_DISCLOSURES.PDF.
42. Sommerstein, R.; Fux, C.A.; Vuichard-Gysin, D.; Abbas, M.; Marschall, J.; Balmelli, C.; Troillet, N.; Harbarth, S.; Schlegel, M.; Widmer, A.; et al. Risk of SARS-CoV-2 Transmission by Aerosols, the Rational Use of Masks, and Protection of Healthcare Workers from COVID-19. *Antimicrob Resist Infect Control* **2020**, *9*, 1–8, doi:10.1186/S13756-020-00763-0/TABLES/3.
43. Jarvis, M.C. Aerosol Transmission of SARS-CoV-2: Physical Principles and Implications. *Front Public Health* **2020**, *8*, 813, doi:10.3389/FPUBH.2020.590041/BIBTEX.
44. Harrison, A.G.; Lin, T.; Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* **2020**, *41*, 1100–1115, doi:10.1016/J.IT.2020.10.004.
45. Tomar, B.; Anders, H.J.; Desai, J.; Mulay, S.R. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/CELLS9061383.
46. Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; Shi, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 141, doi:10.1038/S41579-020-00459-7.
47. Wang, M.Y.; Zhao, R.; Gao, L.J.; Gao, X.F.; Wang, D.P.; Cao, J.M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, doi:10.3389/FCIMB.2020.587269.
48. Harapan, B.N.; Hyeon, .; Yoo, J. Neurological Symptoms, Manifestations, and Complications Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Coronavirus Disease 19 (COVID-19). *J Neurol* **2021**, *268*, 3059–3071, doi:10.1007/s00415-021-10406-y.
49. Aghagoli, G.; Gallo Marin, B.; Katchur, N.J.; Chaves-Sell, F.; Asaad, W.F.; Murphy, S.A. Neurological Involvement in COVID-19 and Potential

- Mechanisms: A Review. *Neurocrit Care* **2021**, *34*, 1062–1071, doi:10.1007/S12028-020-01049-4.
50. Carabelli, A.M.; Peacock, T.P.; Thorne, L.G.; Harvey, W.T.; Hughes, J.; Peacock, S.J.; Barclay, W.S.; De Silva, T.I.; Towers, G.J.; Robertson, D.L. SARS-CoV-2 Variant Biology: Immune Escape, Transmission and Fitness. *Nat Rev Microbiol* **2023**, *21*, 162–177.
 51. Organization, W.H. Tracking SARS-CoV-2 Variants Available online: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (accessed on 31 October 2022).
 52. Choi, J.Y.; Smith, D.M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* **2021**, *62*, 961–968, doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961.
 53. Hirabara, S.M.; Serdan, T.D.A.; Gorjao, R.; Masi, L.N.; Pithon-Curi, T.C.; Covas, D.T.; Curi, R.; Durigon, E.L. SARS-COV-2 Variants: Differences and Potential of Immune Evasion. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *11*, doi:10.3389/FCIMB.2021.781429.
 54. Hirabara, S.M.; Serdan, T.D.A.; Gorjao, R.; Masi, L.N.; Pithon-Curi, T.C.; Covas, D.T.; Curi, R.; Durigon, E.L. SARS-COV-2 Variants: Differences and Potential of Immune Evasion. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *11*, doi:10.3389/FCIMB.2021.781429.
 55. Choi, J.Y.; Smith, D.M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Yonsei Med J* **2021**, *62*, 961–968, doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961.
 56. Tegally, H.; Wilkinson, E.; Giovanetti, M.; Iranzadeh, A.; Fonseca, V.; Giandhari, J.; Doolabh, D.; Pillay, S.; San, E.J.; Msomi, N.; et al. Detection of a SARS-CoV-2 Variant of Concern in South Africa. *Nature* **2021**, *592*, 438–443, doi:10.1038/S41586-021-03402-9.
 57. Faria, N.R.; Mellan, T.A.; Whittaker, C.; Claro, I.M.; Candido, D.D.S.; Mishra, S.; Crispim, M.A.E.; Sales, F.C.S.; Hawryluk, I.; McCrone, J.T.; et al. Genomics and Epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 Lineage in Manaus, Brazil. *Science* **2021**, *372*, 815, doi:10.1126/SCIENCE.ABH2644.
 58. Deng, X.; Garcia-Knight, M.A.; Khalid, M.M.; Servellita, V.; Wang, C.; Morris, M.K.; Sotomayor-González, A.; Glasner, D.R.; Reyes, K.R.; Gliwa, A.S.; et al. Transmission, Infectivity, and Neutralization of a Spike L452R SARS-CoV-2 Variant. *Cell* **2021**, *184*, 3426–3437.e8, doi:10.1016/j.cell.2021.04.025.
 59. Riley, S.; Wang, H.; Eales, O.; Haw, D.; Walters, C.E.; Ainslie, K.E.C.; Atchison, C.; Fronterre, C.; Diggle, P.J.; Page, A.J.; et al. REACT-1 Round 12 Report: Resurgence of SARS-CoV-2 Infections in England Associated with Increased Frequency of the Delta Variant. *medRxiv* **2021**, 2021.06.17.21259103, doi:10.1101/2021.06.17.21259103.
 60. Jung, C.; Kmiec, D.; Koepke, L.; Zech, F.; Jacob, T.; Sparrer, K.M.J.; Kirchhoff, F. Omicron: What Makes the Latest SARS-CoV-2 Variant of Concern So Concerning? *J Virol* **2022**, *96*, e0207721, doi:10.1128/jvi.02077-21.
 61. Basile, K.; Rockett, R.J.; McPhie, K.; Fennell, M.; Johnson-Mackinnon, J.; Agius, J.E.; Fong, W.; Rahman, H.; Ko, D.; Donavan, L.; et al. Improved

- Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron Variant after Pfizer-BioNTech BNT162b2 COVID-19 Vaccine Boosting. *bioRxiv* **2021**, 2021.12.12.472252, doi:10.1101/2021.12.12.472252.
62. Garcia-Beltran, W.F.; Denis, K.J. St.; Hoelzemer, A.; Lam, E.C.; Nitido, A.D.; Sheehan, M.L.; Berrios, C.; Ofoman, O.; Chang, C.C.; Hauser, B.M.; et al. mRNA-Based COVID-19 Vaccine Boosters Induce Neutralizing Immunity against SARS-CoV-2 Omicron Variant. *medRxiv* **2021**, 2021.12.14.21267755, doi:10.1101/2021.12.14.21267755.
 63. Yang, S.; Yu, Y.; Xu, Y.; Jian, F.; Song, W.; Yisimayi, A.; Wang, P.; Wang, J.; Liu, J.; Yu, L. Fast Evolution of SARS-CoV-2 BA. 2.86 to JN. 1 under Heavy Immune Pressure. *Lancet Infect Dis* **2024**, *24*, e70–e72.
 64. Chakraborty, C.; Bhattacharya, M.; Dhama, K. SARS-CoV-2 Vaccines, Vaccine Development Technologies, and Significant Efforts in Vaccine Development during the Pandemic: The Lessons Learned Might Help to Fight against the next Pandemic. *Vaccines (Basel)* **2023**, *11*, 682.
 65. Valiate, B.V.S.; De Castro, J.T.; Marçal, T.G.; Andrade, L.A.F.; De Oliveira, L.I.; Maia, G.B.F.; Faustino, L.P.; Hojo-Souza, N.S.; Dos Reis, M.A.A.; Bagno, F.F. EVALUATION OF AN RBD-NUCLEOCAPSID FUSION PROTEIN AS A BOOSTER CANDIDATE FOR COVID-19 VACCINE. *iScience* **2024**.
 66. BRASIL Programa Nacional de Imunizações: Calendário Nacional de Vacinação/2020/PNI/MS.
 67. Chavda, V.P.; Valu, D.D.; Parikh, P.K.; Tiwari, N.; Chhipa, A.S.; Shukla, S.; Patel, S.S.; Balar, P.C.; Paiva-Santos, A.C.; Patravale, V. Conventional and Novel Diagnostic Tools for the Diagnosis of Emerging SARS-CoV-2 Variants. *Vaccines (Basel)* **2023**, *11*, 374.
 68. Cheng, L.; Lan, L.; Ramalingam, M.; He, J.; Yang, Y.; Gao, M.; Shi, Z. A Review of Current Effective COVID-19 Testing Methods and Quality Control. *Arch Microbiol* **2023**, *205*, 239.
 69. de Assis, T.S.M.; Freire, M.L.; Carvalho, J. de P.; Rabello, A.; Cota, G. Cost-Effectiveness of Anti-SARS-CoV-2 Antibody Diagnostic Tests in Brazil. *PLoS One* **2022**, *17*, e0264159.
 70. Walsh, K.A.; Jordan, K.; Clyne, B.; Rohde, D.; Drummond, L.; Byrne, P.; Ahern, S.; Carty, P.G.; O'Brien, K.K.; O'Murchu, E. SARS-CoV-2 Detection, Viral Load and Infectivity over the Course of an Infection. *Journal of Infection* **2020**, *81*, 357–371.
 71. Pecoraro, V.; Negro, A.; Pirotti, T.; Trenti, T. Estimate False-negative RT-PCR Rates for SARS-CoV-2. A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur J Clin Invest* **2022**, *52*, e13706.
 72. Roy, S. Physicians' Dilemma of False-Positive RT-PCR for COVID-19: A Case Report. *SN Compr Clin Med* **2021**, *3*, 255–258.
 73. Cheng, L.; Lan, L.; Ramalingam, M.; He, J.; Yang, Y.; Gao, M.; Shi, Z. A Review of Current Effective COVID-19 Testing Methods and Quality Control. *Arch Microbiol* **2023**, *205*, 239.

74. Vedova-Costa, J.M. Dela; Ramos, E.L.P.; Boschero, R.A.; Ferreira, G.N.; Soccol, V.T.; Santiani, M.H.; Pacce, V.D.; Lustosa, B.P.R.; Vicente, V.A.; Soccol, C.R. A Review on COVID-19 Diagnosis Tests Approved for Use in Brazil and the Impact on Pandemic Control. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2021**, *64*, e21200147.
75. Galipeau, Y.; Greig, M.; Liu, G.; Driedger, M.; Langlois, M.-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front Immunol* **2020**, *11*, 610688.
76. Ministério da Saúde *ATUALIZAÇÕES ACERCA DAS “CONDIÇÕES PÓS-COVID” NO ÂMBITO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE*; Brasília, 2023;
77. de Sá Magalhães, S.; Keshavarz-Moore, E. Pichia Pastoris (Komagataella Phaffii) as a Cost-Effective Tool for Vaccine Production for Low- and Middle-Income Countries (LMICs). *Bioengineering* **2021**, *8*, doi:10.3390/BIOENGINEERING8090119.
78. Heisteringer, L.; Gasser, B.; Mattanovich, D. Microbe Profile: Komagataella Phaffii: A Methanol Devouring Biotech Yeast Formerly Known as Pichia Pastoris. *Microbiology (N Y)* **2020**, *166*, 614–616, doi:https://doi.org/10.1099/mic.0.000958.
79. de Sá Magalhães, S.; Keshavarz-Moore, E. Pichia Pastoris (Komagataella Phaffii) as a Cost-Effective Tool for Vaccine Production for Low- and Middle-Income Countries (LMICs). *Bioengineering* **2021**, *8*, doi:10.3390/BIOENGINEERING8090119.
80. Xisto, M.F.; Prates, J.W.O.; Dias, I.M.; Dias, R.S.; Da Silva, C.C.; De Paula, S.O. NS1 Recombinant Proteins Are Efficiently Produced in Pichia Pastoris and Have Great Potential for Use in Diagnostic Kits for Dengue Virus Infections. *Diagnostics* **2020**, *Vol. 10*, *Page 379* **2020**, *10*, 379, doi:10.3390/DIAGNOSTICS10060379.
81. Lünsdorf, H.; Gurramkonda, C.; Adnan, A.; Khanna, N.; Rinas, U. Virus-like Particle Production with Yeast: Ultrastructural and Immunocytochemical Insights into Pichia Pastoris Producing High Levels of the Hepatitis B Surface Antigen. *Microb Cell Fact* **2011**, *10*, 48, doi:10.1186/1475-2859-10-48.
82. Hardy, E.; Martínez, E.; Diago, D.; Díaz, R.; González, D.; Herrera, L. Large-Scale Production of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen from Pichia Pastoris. *J Biotechnol* **2000**, *77*, 157–167, doi:10.1016/S0168-1656(99)00201-1.
83. Wasilenko, J.L.; Sarmiento, L.; Spatz, S.; Pantin-Jackwood, M. Cell Surface Display of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin on the Surface of Pichia Pastoris Cells Using α -Agglutinin for Production of Oral Vaccines. *Biotechnol Prog* **2010**, *26*, 542–547, doi:10.1002/BTPR.343.
84. Krainer, F.W.; Dietzsch, C.; Hajek, T.; Herwig, C.; Spadiut, O.; Glieder, A. Recombinant Protein Expression in Pichia Pastoris Strains with an Engineered Methanol Utilization Pathway. *Microb Cell Fact* **2012**, *11*, 22, doi:10.1186/1475-2859-11-22.
85. Ahmad, M.; Hirz, M.; Pichler, H.; Schwab, H. Protein Expression in Pichia Pastoris: Recent Achievements and Perspectives for Heterologous Protein

- Production. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, 98, 5301, doi:10.1007/S00253-014-5732-5.
86. Lu, H.; Stratton, C.W.; Tang, Y.W. Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan, China: The Mystery and the Miracle. *J Med Virol* **2020**, 92, 401, doi:10.1002/JMV.25678.
87. Organization, W.H. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19-11 March 2020 2020.
88. Dong, E.; Du, H.; Gardner, L. An Interactive Web-Based Dashboard to Track COVID-19 in Real Time. *Lancet Infect Dis* **2020**, 20, 533–534, doi:10.1016/S1473-3099(20)30120-1.
89. Lytras, S.; Xia, W.; Hughes, J.; Jiang, X.; Robertson, D.L. The Animal Origin of SARS-CoV-2. *Science (1979)* **2021**, 373, 968–970, doi:10.1126/SCIENCE.ABH0117/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABH0117_TABLE_S1.CSV.
90. Grant, O.C.; Montgomery, D.; Ito, K.; Woods, R.J. Analysis of the SARS-CoV-2 Spike Protein Glycan Shield: Implications for Immune Recognition. *bioRxiv* 2020.
91. Casalino, L.; Gaieb, Z.; Goldsmith, J.A.; Hjorth, C.K.; Dommer, A.C.; Harbison, A.M.; Fogarty, C.A.; Barros, E.P.; Taylor, B.C.; McLellan, J.S.; et al. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci* **2020**, 6, 1722–1734, doi:10.1021/acscentsci.0c01056.
92. Heisteringer, L.; Gasser, B.; Mattanovich, D. Microbe Profile: Komagataella Phaffii: A Methanol Devouring Biotech Yeast Formerly Known as Pichia Pastoris. *Microbiology (N Y)* **2020**, 166, 614–616, doi:https://doi.org/10.1099/mic.0.000958.
93. Pollet, J.; Chen, W.-H.; Versteeg, L.; Keegan, B.; Zhan, B.; Wei, J.; Liu, Z.; Lee, J.; Kundu, R.; Adhikari, R.; et al. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A Yeast-Expressed SARS-CoV-2 Recombinant Receptor-Binding Domain Candidate Vaccine Stimulates Virus Neutralizing Antibodies and T-Cell Immunity in Mice. *bioRxiv* **2021**, doi:10.1101/2020.11.04.367359.
94. Zang, J.; Zhu, Y.; Zhou, Y.; Gu, C.; Yi, Y.; Wang, S.; Xu, S.; Hu, G.; Du, S.; Yin, Y.; et al. Yeast-Produced RBD-Based Recombinant Protein Vaccines Elicit Broadly Neutralizing Antibodies and Durable Protective Immunity against SARS-CoV-2 Infection. *Cell Discov* **2021**, 7, doi:10.1038/s41421-021-00315-9.
95. Arbeitman, C.R.; Auge, G.; Blaustein, M.; Bredeston, L.; Corapi, E.S.; Craig, P.O.; Cossio, L.A.; Dain, L.; D'Alessio, C.; Elias, F.; et al. Structural and Functional Comparison of SARS-CoV-2-Spike Receptor Binding Domain Produced in Pichia Pastoris and Mammalian Cells. *Sci Rep* **2020**, 10, 21779, doi:10.1038/s41598-020-78711-6.
96. da Costa, H.H.M.; Silva, V.O.; Amorim, G.C.; Guereschi, M.G.; Sergio, L.M.; Gomes, C.H.R.; Hong, M.A.; de Oliveira, E.L.; de Macedo Brígido, L.F.; Lindoso, J.A.L. Assessment of an In-House IgG ELISA Targeting SARS-CoV-2 RBD: Applications in Infected and Vaccinated Individuals. *J Immunol Methods* **2024**, 530, 113683.

97. Mehdi, F.; Chattopadhyay, S.; Thiruvengadam, R.; Yadav, S.; Kumar, M.; Sinha, S.K.; Goswami, S.; Kshetrapal, P.; Wadhwa, N.; Chandramouli Natchu, U. Development of a Fast SARS-CoV-2 IgG ELISA, Based on Receptor-Binding Domain, and Its Comparative Evaluation Using Temporally Segregated Samples from RT-PCR Positive Individuals. *Front Microbiol* **2021**, *11*, 618097.
98. Idrovo-Hidalgo, T.; Pignataro, M.F.; Bredeston, L.M.; Elias, F.; Herrera, M.G.; Pavan, M.F.; Foscaldi, S.; Suireszcz, M.; Fernández, N.B.; Wetzler, D.E. Deglycosylated RBD Produced in *Pichia Pastoris* as a Low-Cost Sera COVID-19 Diagnosis Tool and a Vaccine Candidate. *Glycobiology* **2024**, *34*, cwad089.
99. Hussein, N.A.; Ali, E.A.A.; El-Hakim, A.E.; Tabll, A.A.; El-Shershaby, A.; Salamony, A.; Shaheen, M.N.F.; Ali, I.; Elshall, M.; Shahein, Y.E. Assessment of Specific Human Antibodies against SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain by Rapid in-House ELISA. *Hum Antibodies* **2022**, *30*, 105–115.
100. Raoufi, E.; Hosseini, F.; Onagh, B.; Salehi-Shadkami, M.; Mehrali, M.; Mohsenzadegan, M.; Ho, J.Q.; Bigdelou, B.; Sepand, M.R.; Webster, T.J. Designing and Developing a Sensitive and Specific SARS-CoV-2 RBD IgG Detection Kit for Identifying Positive Human Samples. *Clinica Chimica Acta* **2023**, *542*, 117279.
101. Nosedá, D.G.; D'Alessio, C.; Santos, J.; Idrovo-Hidalgo, T.; Pignataro, F.; Wetzler, D.E.; Gentili, H.; Nadra, A.D.; Roman, E.; Paván, C. Development of a Cost-Effective Process for the Heterologous Production of SARS-CoV-2 Spike Receptor Binding Domain Using *Pichia Pastoris* in Stirred-Tank Bioreactor. *Fermentation* **2023**, *9*, 497.
102. Nagar, G.; Jain, S.; Rajurkar, M.; Lothe, R.; Rao, H.; Majumdar, S.; Gautam, M.; Rodriguez-Aponte, S.A.; Crowell, L.E.; Love, J.C. Large-Scale Purification and Characterization of Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD) of SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in Yeast. *Vaccines (Basel)* **2023**, *11*, 1602.
103. Mehdi, F.; Chattopadhyay, S.; Thiruvengadam, R.; Yadav, S.; Kumar, M.; Sinha, S.K.; Goswami, S.; Kshetrapal, P.; Wadhwa, N.; Chandramouli Natchu, U. Development of a Fast SARS-CoV-2 IgG ELISA, Based on Receptor-Binding Domain, and Its Comparative Evaluation Using Temporally Segregated Samples from RT-PCR Positive Individuals. *Front Microbiol* **2021**, *11*, 618097.
104. Márquez-Ipiña, A.R.; González-González, E.; Rodríguez-Sánchez, I.P.; Lara-Mayorga, I.M.; Mejía-Manzano, L.A.; Sánchez-Salazar, M.G.; González-Valdez, J.G.; Ortiz-López, R.; Rojas-Martínez, A.; Trujillo-de Santiago, G. Serological Test to Determine Exposure to SARS-CoV-2: ELISA Based on the Receptor-Binding Domain of the Spike Protein (S-RBDN318-V510) Expressed in *Escherichia Coli*. *Diagnostics* **2021**, *11*, 271.
105. Green, M.R.; Sambrook, J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual 4th* **2012**.
106. Invitrogen Corporation User Manual - EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. *Cat. no. K1740-01* **2010**, 95.
107. Xisto, M.F.; Prates, J.W.O.; Dias, I.M.; Dias, R.S.; Da Silva, C.C.; De Paula, S.O. NS1 Recombinant Proteins Are Efficiently Produced in *Pichia Pastoris* and

- Have Great Potential for Use in Diagnostic Kits for Dengue Virus Infections. *Diagnostics* **2020**, Vol. *10*, Page *379* **2020**, *10*, 379, doi:10.3390/DIAGNOSTICS10060379.
108. Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havli, J.; Olsen, J. V; Mann, M. In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2856–2860, doi:10.1038/nprot.2006.468.
 109. Arbeitman, C.R.; Auge, G.; Blaustein, M.; Bredeston, L.; Corapi, E.S.; Craig, P.O.; Cossio, L.A.; Dain, L.; D’Alessio, C.; Elias, F.; et al. Structural and Functional Comparison of SARS-CoV-2-Spike Receptor Binding Domain Produced in *Pichia Pastoris* and Mammalian Cells. *Sci Rep* **2020**, *10*, 21779, doi:10.1038/s41598-020-78711-6.
 110. Dalvie, N.C.; Rodriguez-Aponte, S.A.; Hartwell, B.L.; Tostanoski, L.H.; Biedermann, A.M.; Crowell, L.E.; Kaur, K.; Kumru, O.S.; Carter, L.; Yu, J.; et al. Engineered SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Improves Manufacturability in Yeast and Immunogenicity in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2106845118, doi:10.1073/PNAS.2106845118/SUPPL_FILE/PNAS.2106845118.SAPP.PDF.
 111. Zang, J.; Zhu, Y.; Zhou, Y.; Gu, C.; Yi, Y.; Wang, S.; Xu, S.; Hu, G.; Du, S.; Yin, Y.; et al. Yeast-Produced RBD-Based Recombinant Protein Vaccines Elicit Broadly Neutralizing Antibodies and Durable Protective Immunity against SARS-CoV-2 Infection. *Cell Discov* **2021**, *7*, doi:10.1038/s41421-021-00315-9.
 112. Xu, W.; Wang, M.; Yu, D.; Zhang, X. Variations in SARS-CoV-2 Spike Protein Cell Epitopes and Glycosylation Profiles During Global Transmission Course of COVID-19. *Front Immunol* **2020**, *11*, 2222, doi:10.3389/FIMMU.2020.565278/BIBTEX.
 113. 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* **2020**, *30*, 981–988, doi:10.1093/GLYCOB/CWAA042.
 114. Andersen, K.G.; Rambaut, A.; Lipkin, W.I.; Holmes, E.C.; Garry, R.F. The Proximal Origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* **2020**, *26*, 450–452, doi:10.1038/s41591-020-0820-9.
 115. 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* **2020**, *30*, 981–988, doi:10.1093/GLYCOB/CWAA042.
 116. Gupta, R.; Brunak, S. Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function 2001.
 117. Pino, M.; Abid, T.; Ribeiro, S.P.; Edara, V.V.; Floyd, K.; Smith, J.C.; Latif, M.B.; Pacheco-Sanchez, G.; Dutta, D.; Wang, S.; et al. A Yeast Expressed RBD-Based SARS-CoV-2 Vaccine Formulated with 3M-052-Alum Adjuvant Promotes Protective Efficacy in Non-Human Primates. *Sci Immunol* **2021**, *6*, doi:10.1126/SCIIMMUNOL.ABH3634.
 118. Chen, W.H.; Du, L.; Chag, S.M.; Ma, C.; Tricoche, N.; Tao, X.; Seid, C.A.; Hudspeth, E.M.; Lustigman, S.; Tseng, C.T.K.; et al. Yeast-Expressed Recombinant Protein of the Receptor-Binding Domain in SARS-CoV Spike

- Protein with Deglycosylated Forms as a SARS Vaccine Candidate. *Hum Vaccin Immunother* **2014**, *10*, 648–658, doi:10.4161/HV.27464.
119. Gemmill, T.R.; Trimble, R.B. Overview of N- and O-Linked Oligosaccharide Structures Found in Various Yeast Species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1426*, 227–237, doi:10.1016/S0304-4165(98)00126-3.
 120. Yang, J.; Wang, W.; Chen, Z.; Lu, S.; Yang, F.; Bi, Z.; Bao, L.; Mo, F.; Li, X.; Huang, Y.; et al. A Vaccine Targeting the RBD of the S Protein of SARS-CoV-2 Induces Protective Immunity. **2020**, doi:10.1038/s41586-020-2599-8.
 121. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6, doi:10.1016/J.CELL.2020.02.058/ATTACHMENT/0D452E6C-56C8-4028-8AFB-CFC22B1A37FF/MMC2.PDF.
 122. Chen, W.-H.; Tao, X.; Agrawal, A.; Algaissi, A.; Peng, B.-H.; Pollet, J.; Strych, U.; Bottazzi, M.E.; Hotez, P.J.; Lustigman, S.; et al. Yeast-Expressed SARS-CoV Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD219-N1) Formulated with Aluminum Hydroxide Induces Protective Immunity and Reduces Immune Enhancement. *bioRxiv* **2020**, doi:10.1101/2020.05.15.098079.
 123. Pollet, J.; Chen, W.-H.; Versteeg, L.; Keegan, B.; Zhan, B.; Wei, J.; Liu, Z.; Lee, J.; Kundu, R.; Adhikari, R.; et al. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A Yeast-Expressed SARS-CoV-2 Recombinant Receptor-Binding Domain Candidate Vaccine Stimulates Virus Neutralizing Antibodies and T-Cell Immunity in Mice. *bioRxiv* **2021**, doi:10.1101/2020.11.04.367359.
 124. Wang, S.; Rong, Y.; Wang, Y.; Kong, D.; Wang, P.G.; Chen, M.; Kong, Y. Homogeneous Production and Characterization of Recombinant N-GlcNAc-Protein in *Pichia Pastoris*. *Microb Cell Fact* **2020**, *19*, 1–11, doi:10.1186/S12934-020-1280-0/TABLES/1.
 125. Chen, W.H.; Wei, J.; Kundu, R.T.; Adhikari, R.; Liu, Z.; Lee, J.; Versteeg, L.; Poveda, C.; Keegan, B.; Villar, M.J.; et al. Genetic Modification to Design a Stable Yeast-Expressed Recombinant SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a COVID-19 Vaccine Candidate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2021**, *1865*, 129893, doi:10.1016/J.BBAGEN.2021.129893.
 126. Yang, J.; Wang, W.; Chen, Z.; Lu, S.; Yang, F.; Bi, Z.; Bao, L.; Mo, F.; Li, X.; Huang, Y.; et al. A Vaccine Targeting the RBD of the S Protein of SARS-CoV-2 Induces Protective Immunity. **2020**, doi:10.1038/s41586-020-2599-8.
 127. Idrovo-Hidalgo, T.; Pignataro, M.F.; Bredeson, L.M.; Elias, F.; Herrera, M.G.; Pavan, M.F.; Foscardi, S.; Suireszcz, M.; Fernández, N.B.; Wetzler, D.E. Deglycosylated RBD Produced in *Pichia Pastoris* as a Low-Cost Sera COVID-19 Diagnosis Tool and a Vaccine Candidate. *Glycobiology* **2024**, *34*, cwad089.
 128. Becker, K.L.; Ifrim, D.C.; Quintin, J.; Netea, M.G.; van de Veerdonk, F.L. Antifungal Innate Immunity: Recognition and Inflammatory Networks. In *Proceedings of the Seminars in immunopathology*; Springer, 2015; Vol. 37, pp. 107–116.

129. Cota, G.; Freire, M.L.; de Souza, C.S.; Pedras, M.J.; Saliba, J.W.; Faria, V.; Alves, L.L.; Rabello, A.; Avelar, D.M. Diagnostic Performance of Commercially Available COVID-19 Serology Tests in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, *101*, 382–390.
130. Giovanetti, M.; Slavov, S.N.; Fonseca, V.; Wilkinson, E.; Tegally, H.; Patané, J.S.L.; Viala, V.L.; San, E.J.; Rodrigues, E.S.; Santos, E.V. Genomic Epidemiology of the SARS-CoV-2 Epidemic in Brazil. *Nat Microbiol* **2022**, *7*, 1490–1500.
131. Schwarze, M.; Volke, D.; Rojas Echeverri, J.C.; Schick, R.; Lakowa, N.; Grünewald, T.; Wolf, J.; Borte, S.; Scholz, M.; Krizsan, A. Influence of Mutations and N-Glycosylation Sites in the Receptor-Binding Domain (RBD) and the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Variants of Concern on Antibody Binding in ELISA. *Biology (Basel)* **2024**, *13*, 207.
132. Lv, H.; Wu, N.C.; Tsang, O.T.-Y.; Yuan, M.; Perera, R.A.P.M.; Leung, W.S.; So, R.T.Y.; Chan, J.M.C.; Yip, G.K.; Chik, T.S.H. Cross-Reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Rep* **2020**, *31*.
133. Shibata, S.; Ishiguro, T.; Kobayashi, Y.; Koike, M.; Numano, T.; Shimizu, Y.; Takayanagi, N. High Incidence of False-Positive Results of IgG Antibody against SARS-CoV-2 with Rapid Immunochromatographic Antibody Test Due to Human Common Cold Coronavirus Infection. *Respir Med Case Rep* **2020**, *31*, 101180.
134. Spinicci, M.; Bartoloni, A.; Mantella, A.; Zammarchi, L.; Rossolini, G.M.; Antonelli, A. Low Risk of Serological Cross-Reactivity between Dengue and COVID-19. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, e200225.
135. Cheng, Y.-L.; Chao, C.-H.; Lai, Y.-C.; Hsieh, K.-H.; Wang, J.-R.; Wan, S.-W.; Huang, H.-J.; Chuang, Y.-C.; Chuang, W.-J.; Yeh, T.-M. Antibodies against the SARS-CoV-2 S1-RBD Cross-React with Dengue Virus and Hinder Dengue Pathogenesis. *Front Immunol* **2022**, *13*, 941923.
136. Shurrab, F.M.; Al-Sadeq, D.W.; Amanullah, F.H.; Al-Absi, E.S.; Qotba, H.; Yassine, H.M.; Abu-Raddad, L.J.; Nasrallah, G.K. Low Risk of Serological Cross-Reactivity between the Dengue Virus and SARS-CoV-2-IgG Antibodies Using Advanced Detection Assays. *Intervirology* **2022**, *65*, 224–229.
137. Luvira, V.; Leungwutiwong, P.; Thippornchai, N.; Thawornkuno, C.; Chatchen, S.; Chanchaoenthana, W.; Tandhavanant, S.; Muangnoicharoen, S.; Piyaphanee, W.; Chantratita, N. False Positivity of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Patients with Acute Tropical Diseases in Thailand. *Trop Med Infect Dis* **2022**, *7*, 132.

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: Receptor binding domain amino acid sequences. All sequences were codon-optimized for the yeast expression system. Amino acid initials marked in pink represent the original amino acid from the RBD wild-type (WT) sequence. Amino acid initials marked in yellow represent mutations from RBD variant sequences.

RBD-WT

Gene sequence

AGAGTTCAACCTACCGAGAGTATAGTTAGATTCCCCAACATTACCAACCTTTGCC
 CCTTCGGCGAAGTATTCAACGCTACCAGATTTCGCATCTGTTTACGCCTGGAATCG
 AAAGAGAATTTCTAACTGCGTAGCTGATTACTCCGTCCTATACAATTCTGCTTCTT
 TCTCCACATTTAAATGTTACGGAGTCTCACCTACCAAGCTGAATGATCTGTGCTT
 CACTAATGTTTATGCTGATTCCTTTGTTATTAGGGGTGATGAGGTCCGACAAATA
 GCCCCAGGACAGACAGGAAAAATTGCTGACTACAATTATAAGTTGCCTGATGAT
 TTTACCGGTTGCGTTATAGCCTGGAACTCTAACAACTTTGACTCTAAGGTGGGAG
 GTAACTATAACTACCTTTACAGGTTGTTTAGAAAGTCTAATTTAAAACCTTTTTCGA
 AAGGGACATTTCAACTGAAATATATCAAGCTGGCTCTACTCCATGCAACGGCGTT
 GAGGGTTTTAACTGTTACTTCCCCTTACAGTCCTACGGTTTCCAGCCTACGAATG
 GAGTTGGTTACCAACCATACAGGGTAGTAGTCTTGAGTTTTGAACTGCTGCACGC
 TCCTGCTACGGTTTGCGGACCAAAAAAATCTACTAACTTGGTTAAGAATAAGTGT
 GTCAATTTTAATTTCAATGGT (681 bp).

Amino acid sequence

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFST
 FKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGK^YIADYNYKLPDDFTGCV
 IAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVE^EGFNCYF
 PLQSYGFQPTN^NGVGYQPYRVVVLSELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNFG
 (227 aa).

RBD-Alpha

Gene sequence

AGAGTTCAACCAACAGAATCAATAGTGCGTTTTCCCTAATATCACTAATCTATGCC
 CTTTTGGTGAGGTATTTAATGCAACTAGGTTTGCTTCTGTTTACGCATGGAACCGA

AAACGTATCTCAAACCTGCGTTGCTGACTACTCAGTACTATATAACAGTGCTTCCT
 TTTCAACCTTTAAATGTTATGGAGTCAGTCCTACTAAATTAACGATTTGTGCTTT
 ACTAACGTCTATGCTGACTCCTTTGTCATTAGAGGTGACGAAGTTAGACAAATCG
 CTCCAGGTCAGACGGGCAAGATTGCTGATTATAATTACAAGCTGCCCGACGATTT
 TACCGGTTGTGTTATCGCTTGGAACCTAACAATTTGGACTCAAAAAGTTGGCGGT
 AACTACAACCTTTATAGATTGTTTCGAAAGTCTAATCTTAAGCCCTTCGAGA
 GAGATATTTCAACCGAAATATACCAAGCCGGATCCACACCTTGCAATGGTGTGG
 AGGGATTTAACTGCTATTTCCCACTTCAATCCTACGGTTTTTCAGCCAACGTATGGT
 GTCGGATACCAGCCATATAGAGTTGTTGTCCTTAGTTTTGAACTGTTGCACGCTC
 CCGCCACCGTATGTGGACCTAAGAAGTCAACCAACTTGGTAAAGAACAATGCG
 TGAACCTCAACTTCAACGGC (681 bp).

Amino acid sequence

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNASFSST
 FKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCV
 IAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
 PLQSYGFQPT^YGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNFG
 (227 aa).

RBD-Beta

Gene sequence

AGAGTTCAACCAACTGAGTCAATAGTGAGATTCCCAAACATTACTAATCTTTGTC
 CTTTCGGTGAAGTTTTTAACGCCACGCGTTTCGCTAGTGTCTATGCTTGGAACCG
 AAAGAGAATCTCAAACCTGTGTCGCCGATTACAGTGTTTTATAACAATTCTGCTTCC
 TTTCCACCTTTAAATGTTACGGCGTTTCTCCTACTAAGCTGAACGATTTGTGTTT
 CACTAATGTTTACGCTGACAGTTTTGTCATACGAGGCGATGAGGTCAGACAAATT
 GCACCCGGTCAGACTGGAAATATTGCTGATTATAACTACAAGTTGCCTGATGACT
 TCACTGGATGTGTGATTGCCTGGAACAGTAATAACTTGGACAGTAAAGTGGGAG
 GAAACTACAATTACCTTTACAGACTATTCAGAAAATCTAACCTGAAGCCATTTGA
 GAGAGACATTTCTACCGAAATATATCAAGCAGGTTCTACACCATGTAACGGTGT
 AAAGGTTTTAACTGTTACTTCCCCCTCAGTCATACGGTTTCCAGCCTACTTATGG
 AGTTGGTTATCAGCCATACAGGGTTGTGGTGCTTTCTTTTGAGTTACTACACGCTC
 CCGCTACTGTCTGTGGTCCCAAAAAATCCACTAATCTAGTTAAAAACAAGTGTGT
 CAATTTAACTTTAATGGT (681 bp).

Amino acid sequence

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFST
 FKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCV
 IAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNCYF
 PLQSYGFQPTYGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNNG
 (227 aa).

RBD-Gamma**Gene sequence**

AGAGTACAACCTACGGAGTCTATCGTGCGTTTTCCCAATATAACAACTTGTGTC
 CATTCCGGTGAAGTCTTCAACGCTACACGTTTTGCTTCCGTTTATGCTTGGAACCGT
 AAGAGAATCAGTAATTGTGTGGCTGATTACAGTGTTCTATAACAATTCTGCCTCTTT
 TTCAACCTTTAAGTGCTACGGCGTTAGTCCTACGAAGCTTAACGACTTGTGTTTC
 ACTAATGTGTACGCAGATTCATTTGTCATAAGGGGTGATGAAGTCAGACAAATCG
 CTCCTGGTCAAACCGGTACAATCGCTGACTATAACTACAAGCTTCCCGACGACTT
 TACCGGATGTGTTATAGCTTGGAACTCCAACAACCTGGATTCCAAGGTTGGTGGT
 AATTACAACATTTTATACAGATTGTTTCAGAAAGTCTAATTTGAAACCATTCGAAC
 GTGACATTAGTACAGAGATTTATCAAGCTGGCTCTACTCCATGCAATGGTGTAAA
 GGGTTTCAATTGTTATTTTCCTTTGCAGTCCTACGGATTCCAACCAACTTACGGTG
 TCGGTTATCAACCATATAGGGTGGTAGTCCTGTCCCTCGAACTATTACATGCTCC
 AGCAACGGTCTGCGGCCCTAAAAAGTCAACTAATCTGGTTAAGAACAAGTGTGT
 GAACTTCAATTTCAATGGA (681 bp).

Amino acid sequence

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFST
 FKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGCVI
 AAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNCYFP
 LQSYGFQPTYGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNNG
 (227 aa).

7. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, foi avaliada a produção das proteínas recombinantes Domínio de ligação ao receptor de SARS-CoV-2, provenientes da linhagem selvagem e variantes Alfa, Beta e Gama utilizando a levedura *K. phaffii* como sistema de expressão. Foi verificada a produção eficiente destas proteínas em pequena escala. No entanto, dada a adaptabilidade de *K. phaffii*, é possível realizar a produção em maior escala com biorreatores obtendo uma maior quantidade destas proteínas. Foi verificado que as proteínas são altamente glicosiladas pela levedura, o que levou ao aumento do peso molecular. No entanto, este fato não impediu a detecção das proteínas por anticorpos específicos a cauda de histidinas e pelo pool de soros IgG positivos para COVID-19, com exceção do anticorpo anti-*Spike*, que somente detectou as proteínas após digestão com endoglicosidase.

As proteínas recombinantes foram empregadas como antígeno de captura em teste ELISA para detecção de IgG para SARS-CoV-2. A partir do teste de diferentes condições de ensaio, os parâmetros de sensibilidade e especificidade apresentaram os melhores resultados empregando a proteína após reação de deglicosilação e soros diluídos em tampão contendo manose. Apesar disso, os resultados obtidos ainda são considerados baixos em relação ao esperado para um teste diagnóstico, principalmente em relação ao parâmetro de especificidade. Portanto, mais testes são necessários para otimização das condições de ensaio.

Visto que boa parte dos testes diagnósticos utilizados no país são importados e o encarecimento destes se relaciona principalmente a obtenção do antígeno, é de fundamental importância a exploração de novas tecnologias nacionais para o fortalecimento da independência nacional no enfrentamento desta e possíveis pandemias no futuro. O conhecimento aqui gerado proverá base para futuras melhorias e otimizações da produção de antígenos de SARS-CoV-2 para aplicações biotecnológicas.