MARCEL ARRUDA DIOGO

DESENHO RACIONAL E EXPRESSÃO DE ANTICORPOS scFv COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

Coorientador: Marcelo Depólo Polêto

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021

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

T

D591d
2021

Diogo, Marcel Arruda, 1995-
Desenho racional e expressão de anticorpos scFv como ferramenta biotecnológica no diagnóstico da COVID-19 / Marcel Arruda Diogo. - Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (197 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.
Inclui apêndices.
Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2021.
Referências bibliográficas: f.144-170.
DOI: https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.046
Modo de acesso: World Wide Web.

1. SARS-CoV-2. 2. Anticorpos de Cadeia Única. 3. Glicoproteína da Espícula de Coronavírus. 4. Receptores de Coronavírus. 5. Teste de Ácido Nucleico para COVID-19. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 614.592

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

MARCEL ARRUDA DIOGO

DESENHO RACIONAL E EXPRESSÃO DE ANTICORPOS scFv COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de outubro de 2021.

Assentimento:

Marcel Arruda Diogo
Autor

Juliana Lopes Rangel Fietto
Orientadora

Este trabalho é dedicado a todas as vítimas acometidas pela COVID-19 e aos seus familiares.

"...amanhã há de ser outro dia..."

Chico Buarque

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha orientadora Juliana Fietto por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e aos meus coorientadores Marcelo Depólo e Gustavo Bressan por todo conhecimento passado.

Aos meus amigos da FacFar-UFJF Bruno, Bia, Artur, Tiago e Julia, que apesar da distância sempre estiveram comigo.

À minha segunda família de Viçosa: Kim, Eugênio, Gabriel, Lucas, Yan, Rizi e Bruno. Obrigado pelo acolhimento, pelas conversas e pelo suporte, sem vocês tudo seria mais difícil.

Um agradecimento especial para a Flávia e Luana, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigado por me acompanhar durante todo processo, me ajudando nos experimentos, me oferecendo um ombro amigo, ficando do meu lado dia e noite. Sou muito grato a vocês.

Aos meus grandes amigos da bancada e da vida: Samu, Ju Leopoldo, Letícia, Ginnie, Elói e Larissa Rabbit. Vocês são incríveis, vou levar para sempre comigo.

Aos amores da minha vida: Mabi, Nanda, Jheniffer, Luisa, Emily, Sarah, Duda, Talita e Maria Clara. Obrigado por serem meu refúgio e meu abrigo. Pelas risadas e pelas bebidas. Vocês são tudo para mim, estão para sempre no meu coração.

Ao Lu por todo suporte, força e momento de distração.

Ao meu grande amigo Davi, por ter me apoiado e ficado ao meu lado durante os incansáveis dias de preparo para o processo seletivo.

Aos meus queridos do Liminha Lethicia, Victor, Tati e Nancy. Carrego um pouqinho de cada um comigo. Obrigado pelas risadas, pelos ensinamentos e pelo suporte. Tenho uma grande admiração por cada um.

Aos meus professores amigos da UFJF Pri e Lu pelas conversas, conselhos e amizade.

Ao meu *roommate* Bruno pela paciência, amizade e conversas.

A toda equipe da Vila Fit por ter me fornecido uma válvula de escape.

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal e ao Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos por proporcionar a execução desse trabalho, e toda sua equipe por realizar trabalhos incríveis e de excelente qualidade.

À minha mãe e aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado,

À Universidade Federal de Viçosa, ao Laboratório Nacional de Computação Científica, a empresa Recombine Biotech e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio fornecido para a excecução desse trabalho.

Marielle Franco presente!

“Caminho se conhece andando, então vez em quando é bom se perder...”

Chico César

RESUMO

ARRUDA-DIOGO, Marcel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Desenho racional e expressão de anticorpos scFv como ferramenta biotecnológica no diagnóstico da COVID-19**. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientador: Marcelo Depólo Polêto.

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa causada pelo novo coronavirus SARS-CoV-2 e declarada pandêmica pela Organização Mundial da Saúde no dia 11 de março de 2020. Os sintomas da doença variam deste um resfriado até falência múltipla de órgãos, culminado na morte do panciente. O diagnóstico confirmatório da doença é realizada pelo método da RT - PCR. Entretanto, as limitações atribuídas a técnica se fez necessário o desenvolvimento de novos métodos para auxiliar no rastreio da doença, os quais não apresentam sensibilidade e especificidade satisfatórias. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um anticorpo scFv engenheirado direcionado a um epítopo localizado na proteína *spike* presente na membrana do vírus utilizando ferramentas de biofísica computacional e produzir a proteína recombinante por expressão heteróloga em *E. coli* para ser aplicada no desenvolvimento um novo teste diagnóstico acurado, de manuseio fácil e de ampla distribuição para auxiliar no combate da COVID-19. O capítulo 1 deste trabalho apresenta toda a metodologia utilizada para desenhar o anticorpo scFv otimizado, o qual foi produzido a partir de métodos como a modelagem computacional, mutações sítio-dirigidas e simulações de dinâmica molecular. O capítulo 2 demonstra todos os processos realizados no desenho e obtenção do gene sintético, padronização da expressão e purificação dos anticorpos scFv recombinantes e os testes de estabilidade das proteínas. A combinação de métodos *in silico* e *in vitro* se mostra promissor no desenvolvimento de novos produtos biotenológicos, em menor tempo de produção e também menor custo do produto final, sendo de suma importância em cenários emergenciais como a pandemia da COVID-19.

Palavras-chave: ScFv anti-*Spike* do SARS-CoV-2. Fragmento de cadeia única Fv de anticorpo anti-Spike do SARS-CoV-2. Anticorpo anti-Spike do SARS-CoV-2. Diagnótico de COVID-19. Anticorpo monoclonal anti-SARS-CoV-2.

ABSTRACT

ARRUDA-DIOGO, Marcel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Rational design and expression of scFv antibodies as a biotechnological tool in the diagnosis of COVID-19**. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-adviser: Marcelo Depólo Polêto.

COVID-19 is a highly contagious disease caused by the new coronavirus SARS-CoV-2 and declared as pandemic by the World Health Organization on March 11, 2020. The disease symptoms range from a cold to multiple organ failure, culminating in death of the patient. Confirmatory diagnosis of the disease is performed by RT - PCR method. However, the limitations attributed to the technique made it necessary to develop new methods to assist in screening for the disease, which do not present satisfactory sensitivity and specificity. Thus, the objective of this work was to develop an engineered scFv antibody directed to an epitope located in the spike protein present in the virus membrane using computational biophysics tools and to produce a recombinant protein by heterologous expression in *E. coli* to be apply in development of a new accurate diagnostic test, easy handling and wide distribution to help fight against COVID-19. Chapter 1 of this work presents the entire methodology used to design the optimized scFv antibody, which was produced from methods such as computational modeling, site-directed mutations and molecular dynamics simulations. Chapter 2 demonstrates all the processes performed in the design and production of the synthetic gene, standardization of expression and purification of recombinant scFv antibody and protein stability tests. The combination of in *silico* and in *vitro* methods shows promise in the development of new biotechnological products, with shorter production time and also lower cost of the final product, being of paramount importance in emergency scenarios such as the COVID-19 pandemic.

Keywords: SARS-CoV-2 anti-Spike scFv. SARS-CoV-2 anti-Spike antibody Fv single chain fragment. Anti-SARS-CoV-2 Spike antibody. COVID-19 diagnostic. Anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Origem zoonótica de alguns coronavirus humanos (HCoV)..... 26

Figura 2 - Estrutura e organização genômica do vírus SARS-CoV-2..... 27

Figura 3 - Ativação da proteína S do SARS-CoV-2..... 30

Figura 4 - Estrutura e organização genômica do vírus SARS-CoV-2..... 31

Figura 5 - Sintomatologia da COVID-19 de acordo com a faixa etária..... 33

Figura 6 - Métodos de triagem e diagnóstico da COVID-19..... 35

Figura 7 - Esquema ilustrado do método de diagnóstico da COVID-19 por RT – PCR..... 36

Figura 8 - Produção de IgM e IgG de acordo com o tempo de infecção pelo SARS-CoV-2..... 37

Figura 9 - Esquema ilustrando do método de diagnóstico da COVID-19 por meio do teste rápido sorológico..... 38

CAPÍTULO 1..... 41

DESENHO RACIONAL DE ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2 COMO FORMA DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS OTIMIZADAS UTILIZANDO DA BIOFÍSICA COMPUTACIONAL

Figura 10 - Histórico de desenvolvimento dos anticorpos monoclonais..... 42

Figura 11 - Processo de humanização de anticorpos monoclonais com o objetivo de diminuir as reações antigênicas causadas pela molécula..... 43

Figura 12 - Principais propriedades envolvidas no desenho racional de anticorpos..... 45

Figura 13 - Principais etapas envolvidas no desenho racional de anticorpos por metodologia *de novo*..... 46

Figura 14 - Principais classes de anticorpos encontrados em soro humano e algumas funções desempenhadas durante a proteção do organismo coordenadas pelo sistema imunológico..... 48

Figura 15 - Estrutura tridimensional um anticorpo PDB ID 1IGT..... 49

Figura 16 - Vista superior do paratopo de um anticorpo..... 50

Figura 17 - Estrutura de Anticorpo scFv..... 51

Figura 18 - Anticorpos engenheirados a partir de uma estrutura scFv..... 53

Figura 19 - Gráfico esquemático representando a porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos em relação ao tamanho da sequência comparada... 56

Figura 20 - Fluxograma ilustrando o método de modelagem comparativa adotando algoritmos de satisfação de restrições espaciais..... 57

Figura 21 - Método geral esquematizando as principais etapas de construção do anticorpo scFv anti-RBD presente na proteína S do SARS-CoV-2..... 66

Figura 22 - MutateX: mutações sítio-dirigidas..... 70

Figura 23 - Estruturas moldes usadas na construção da scFv anti-RBD do SARS-CoV-2..... 75

Figura 24 - Alinhamento estrutural obtido pelo cálculo do RMSD entre o cristal e o modelo scFv-CR3022..... 80

Figura 25 - Anticorpo scFv-CR3022 interagindo com a proteína S (PDB ID 6ZDH).. 81

Figura 26 - Desenho esquemático da superfície de interação entre o anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD apresentando as principais interações iônicas e ligações de hidrogênio..... 85

Figura 27 - Ocorrência de interações cátion-π na interface do complexo anticorpo scFv-CR3022-RBD..... 86

Figura 28 - Interações de longo alcance identificadas na interface do complexo anticorpo scFv-CR3022-RBD..... 87

Figura 29 - Mapa de calor obtido pelos cálculos realizados pelo MutateX..... 89

Figura 30 - Alinhamento estrutural obtido pelo cálculo do RMSD entre o cristal e o modelo scFv MAD22..... 92

Figura 31 - Anticorpo scFv MAD22 interagindo com a proteína S (PDB ID 6ZDH)... 92

Figura 32 - Vista superior do paratopo do anticorpo scFv MAD22..... 93

Figura 33 - Simulação de dinâmica molecular direcionada realizada para os complexos scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV-2, scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV e scFv MAD22-RBD-SARS-CoV-2..... 98

Figura 34 - Gráfico do potencial de forma média obtido pelo método de *Umbrella sampling*..... 99

CAPÍTULO 2..... 101

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DIRETO DA COVID-19

Figura 35 -	Método esquemático da detecção da COVID-19 pelo método de captura de antígeno resumido em 7 principais etapas.....	103
Figura 36 -	Representação gráfica da proteína *Spike*.....	104
Figura 37 -	Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas RBD presentes nos vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2.....	105
Figura 38 -	Monômero da proteína *Spike*.....	106
Figura 39 -	Expressão heteróloga de proteínas recombinantes no espaço periplasmático da célula bacteriana.....	109
Figura 40 -	Mapa do vetor pET27b(+) utilizado na clonagem do gene sintético para a expressão dos anticorpos.....	126
Figura 41 -	Modelo esquemático geral utilizado na construção do gene sintético para a expressão de ambos anticorpos scFv.....	127
Figura 42 -	Placa de petri contendo meio LB canamicina mostrando o processo de seleção dos clones.....	129
Figura 43 -	Amostras de DNA plasmidial extraído por meio do kit *PureYield*™ *Plasmid Miniprep System* em gel de agarose 1% (m/v).....	130
Figura 44 -	*Western blotting* referente ao teste de temperatura de indução realizada para o anticorpo scFv-CR3022.....	132
Figura 45 -	*Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 recombinante obtidos na fração solúvel a 30ºC durante 48h.....	133
Figura 46 -	*Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 recombinante obtidos na fração solúvel a 37ºC durante 48h.....	135
Figura 47 -	*Western blotting* referente ao teste de temperatura de indução realizada para o anticorpo scFv MAD22.....	134
Figura 48 -	*Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-MAD22 recombinante obtidos na fração solúvel a 25ºC durante 48h.....	135
Figura 49 -	Gel de poliacrilamida contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 obtidas após a purificação da proteína expressa na fração periplasmática da célula bacteriana.....	137
Figura 50 -	Gel de poliacrilamida contendo alíquotas do anticorpo scFv MAD22 obtidas após a purificação da proteína expressa na fração periplasmática da célula bacteriana.....	138
Figura 51 -	Alíquotas de anticorpo scFv-CR3022 dialisadas em tampão carbonato pH 9.6.....	139
Figura 52 -	Alíquotas de anticorpo scFv MAD22 dialisadas em tampão carbonato pH 9.6.....	140
Figura 53 -	Teste de estabilidade das proteínas recombinantes em diferentes temperaturas: 25ºC, 4ºC e -20ºC.....	141

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1..... 41

DESENHO RACIONAL DE ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2 COMO FORMA DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS OTIMIZADAS UTILIZANDO DA BIOFÍSICA COMPUTACIONAL

Tabela 1 - Anticorpos scFv em fase de estudo ou aprovados pelo FDA como biomolécula aplicada no tratamento de diferentes doenças..... 52

Tabela 2 - Processos de validação da estrutura do anticorpo em formato scFv-CR3022..... 76

Tabela 3 - Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presente na interface de interação do anticorpo scFv-C3022 realizado pelos servidores PRODIGY e PISA..... 83

Tabela 4 - Caracterização do tipo de interação formada entre os resíduos de aminoácidos presentes na interface do complexo scFv-CR3022-RBD realizado pelo servidor PIC..... 84

Tabela 5 - Resíduos não interagentes presentes no paratopo do anticorpo scFv-CR3022..... 88

Tabela 6 - Processos de validação da estrutura do anticorpo em formato scFv MAD22..... 90

Tabela 7 - Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presente na interface de interação do anticorpo scFv MAD22 realizado pelos servidores PRODIGY e PISA, tendo em destaque (sublinhado) aqueles que foram mutados..... 94

Tabela 8 - Análise comparativa das interações formadas entre os anticorpos scFv e o antígeno RBD para o estudo das consequências ocasionadas pelos cálculos de mutação..... 96

CAPÍTULO 2..... 101

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DIRETO DA COVID-19

Tabela 9 - Algumas vantagens e desvantagens atribuídas aos principais sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes..... 108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAST

+ssRNA	*Positive-sense single-stranded* RNA.
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs.
ΔΔG	Variação da variação da energia livre de Gibbs.
2019n-CoV	*2019 novel CoV*.
1D	Unidimensional.
3D	Tridimensiona.
AbDesign	*Antibody Design.*
ACE2	*Angiotensin converting enzyme* 2.
ALA	*Alanine*.
ARDS	*Acute respiratory distress syndrome*.
ARG	*Arginine*.
ASP	*Aspartic acid*.
BSA	*Bovine serum albumin.*
Cα	Carbono α.
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio.
CCL-2	*Chemokine (C-C motif) ligand 2.*
CCL-3	*Chemokine (C-C motif) ligand 3.*
CCL-5	*Chemokine (C-C motif) ligand 5.*
CDC	*Centers for disease control and preventio*n.
cDNA	*Complementary* DNA.
CDRs	*Complementarity-determining regions.*
CH	*Heavy chain.*
CHARMM22	*Chemistry at harvard macromolecular mechanics.*
CL	*Light chain.*
CMs	*Convoluted membranes.*
COVID-19	*Coronavirus disease* 2019.
CoVs	*Coronavirus*.
Crio-ME	Microscopia crio-eletrônica.
CTD	*C-terminal domain*.
CXCL-8	*Chemokine (C-X-C motif) ligand 8.*
CXCL-9	*Chemokine (C-X-C motif) ligand 9.*
CXCL-10	*Chemokine (C-X-C motif) ligand 10.*

D.O	Densidade ótica.
DAB	3,3'-diaminobenzidina.
Dsb	*Disulfide bond formation*.
DLS	*Dynamic light scattering*.
DM	Dinâmica molecular.
DMSs	*Double-membrane spherules.*
DMVs	*Double-membrane vesicles.*
DNA	*Deoxyribonucleic acid*.
DOPE	*Discrete optimized protein energy.*
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2.
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.*
EpCAM	*Epithelial cellular adhesion molecule*.
ERGIC	*Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*.
Fab	*Antigen-binding fragment*.
Fc	*Fragment crystallizable*.
FDA	*Food and drug administration*.
FPLC	*Fast protein liquid chromatography*.
Fv	*Fragment variable*.
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating factor*.
GISAID	*Global initiative on sharing all influenza data*.
GLU	*Glutamic acid*.
GLY	*Glycine*.
GROMACS	*Groningen machine for chemical simulations*.
HCoV	*Human coronavirus*.
HCoV-229E	*Human coronavirus* 229E.
HCoV-HKU1	*Human coronavirus* HKU1.
HCoV-OC43	*Human coronavirus* OC43.
HCoV-NL63	*Human coronavirus* NL63.
HER2	*Human epidermal growth factor receptor type* 2.
HSP90	*Heat shock protein* 90.
ICU	*Intensive care unit*.
IgA	*Immunoglobulin* A.
IgA1	*Immunoglobulin* A1.
IgA2	*Immunoglobulin* A2.

IgD	*Immunoglobulin* D.
IgE	*Immunoglobulin* E.
IgG	*Immunoglobulin* G.
IgG1	*Immunoglobulin* G1.
IgG2	*Immunoglobulin* G2.
IgG3	*Immunoglobulin* G3.
IgG4	*Immunoglobulin* G4.
IgM	*Immunoglobulin M*.
IL-1β	*Interleukin 1β*.
IL-2	*Interleukin 2*.
IL-6	*Interleukin 6*.
IL-7	*Interleukin 7*.
IL-10	*Interleukin 10*.
IL-12	*Interleukin 12*.
IL-18	*Interleukin 18*.
IL-33	*Interleukin 33*.
ILE	*Isoleucine*.
IFN-α	Interferon-α
IFN-γ	Interferon-γ
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida.
LB	Luria Bertani.
LEU	*Leucine*.
LINCS	*Linear constraint solver*.
Lpp	*Lipoprotein*.
LTB	*Heat-labile enterotoxin B subunit*.
LYS	*Lysine*.
mAbs	*Monoclonal antibodies*.
MalE	*Maltose-binding protein*.
MET	*Methionine*.
MERS-CoV	*Middle east respiratory syndrome coronavirus*.
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein-1*.
MIP-1α	*Macrophage inflammatory protein-1 α*.
MM	Mecânica molecular.
mRNA	*Messenger* RNA.

NKs	*Natural killers*.
NPT	Número de partícula, pressão e tempertatura constantes.
Nsps	*Non-structural proteins*.
Nsp1	*Non-structural protein* 1.
Nsp2	*Non-structural protein* 2.
Nsp3	*Non-structural protein* 3.
Nsp4	*Non-structural protein* 4.
Nsp5	*Non-structural protein* 5.
Nsp6	*Non-structural protein* 6.
Nsp7	*Non-structural protein* 7.
Nsp8	*Non-structural protein* 8.
Nsp9	*Non-structural protein* 9.
Nsp10	*Non-structural protein* 10.
Nsp12	*Non-structural protein* 12.
Nsp13	*Non-structural protein* 13.
Nsp14	*Non-structural protein* 14.
Nsp15	*Non-structural protein* 15.
Nsp16	*Non-structural protein* 16.
NTD	*N-terminal domain*.
NVT	Número de partícula, volume e tempertatura constantes.
OmpA	*Outer membrane protein* A.
OmpC	*Outer membrane protein* C.
OmpF	*Outer membrane protein* F.
OmpT	*Outer membrane protein* T.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
OptCDR	*Optimal Complementarity Determining Regions.*
OptMAVEn*Optimal*	*Method for antibody variable region engineering.*
ORFs	*Open reading frames*.
ORF1a	*Open reading frame* 1a.
ORF1ab	*Open reading frame* 1ab.
PALS1	*Protein associated with LIN7* 1.
PBS-T	*Phosphate buffered saline - tween*.
PDB	*Protein data bank*.
PelB	*Pectate lyase* B.

pH	Potencial hidrogeniônico.
PHE	*Phenylalanine*.
PhoA	*Alkaline phosphatase* A.
PhoE	*Alkaline phosphatase* E.
pI	Ponto isoelétrico.
PIC	*Protein interactions calculator*.
PISA	*Protein interfaces, surfaces and assemblies*.
PME	*Particle mesh ewald*.
PMF	*Potencial mean force*.
Pp1a	Poliproteína 1a.
Pp1ab	Poliproteína 1ab.
PRO	*Proline*.
PRODIGY	*Protein binding energy*.
ProSA-web	*Protein structure analysis*.
R0	R *nought*.
RAbD	*Rosettaa antibody design*.
RBD	*Receptor binding domain*.
RBM	*Receptor binding motif*.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
RMSD	*Root mean square deviation*.
RNA	*Ribonucleic acid*.
Rpm	Rotação por minuto.
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*.
SADS-CoV	*Swine acute diarrhea syndrome coronavirus*.
SARS	*Severe acute respiratory syndrome*.
SARS-CoV	*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*.
SARS-Cov-2	S*ereve acute respiratory syndrome coronavirus 2*.
ScFv	*Single-chain fragment variable*.
SDS	*Sodium dodecyl sulphate*.
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*.
SER	*Serine*.
SpA	*Staphylococcal protein* A.
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave.
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA.

TES	Tris-EDTA-Sacarose.
TGF-β	*Transforming growth factor β*.
TMPRSS2	*Transmembrane protease, serine* 2.
TNF-α	*Tumor necrosis factor α*.
TRP	*Tryptophan*.
TYR	*Tyrosine*.
UV	Ultravioleta.
VAL	*Valine*.
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*.
WB	*Western blotting*.
YASARA	*Yet another scientific artificial reality application*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... 23

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 24

2.1 *Coronavirus disease* 2019 (COVID-19): Origem e epidemiologia da doença. 24

2.2 A família coronavírus: Aspectos gerais..... 25

2.2.1 Morfologia do SARS-CoV-2 e organização do genoma viral..... 26

2.2.1.1 Proteína Nucleocapsídeo (N)..... 28

2.2.1.2 Proteína Membrana (M)..... 28

2.2.1.3 Proteína do Envelope (E)..... 28

2.2.1.4 Proteína *Spike* (S)..... 29

2.3 Ciclo de replicação do SARS-CoV-2..... 30

2.4 Processos fisiopatológicos da COVID-19: Resposta imunológica frente a infecção pelo SARS-CoV-2..... 32

2.5 Métodos diagnósticos da COVID-19..... 34

2.5.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT - PCR)..... 35

2.5.2 Teste rápido sorológico..... 37

3 JUSTIFICATIVA GERAL..... 40

CAPÍTULO 1..... 41

DESENHO RACIONAL DE ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2 COMO FORMA DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS OTIMIZADAS UTILIZANDO DA BIOFÍSICA COMPUTACIONAL

1 INTRODUÇÃO..... 43

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 42

2.1 Produção de anticorpos monoclonais e engenharia de proteínas..... 42

2.1.1 Desenho racional de anticorpos por meio de abordagens computacionais..... 44

2.2 Estrutura de anticorpo e mecanismo de reconhecimento molecular..... 47

2.2.1 Anticorpos scFv: Vantagens e limitações..... 50

2.3 Métodos de biofísica computacional aplicado ao estudo da estrutura e função de proteínas..... 54

2.3.1 Métodos de construção de modelos tridimensionais..... 54
2.3.1.1 Modelagem comparativa..... 55
2.3.2 Simulações de dinâmica molecular..... 58
3 OBJETIVOS..... 63
3.1 Objetivo geral..... 63
3.2 Objetivos específicos..... 63
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 64
4.1 Construção do modelo de anticorpo scFv anti-RBD-SARS-CoV-2..... 64
4.1.1 Pesquisa por estruturas moldes: *Protein Data Bank* (PDB)..... 65
4.1.2 Desenho da sequência primária do anticorpo scFv: Clustal Omega..... 65
4.1.3 Método de modelagem comparativa: MODELLER 10.1..... 65
4.1.4 Processo de validação do modelo: ProSA-web, PROCHEK, VERIFY3D e ERRAT..... 66
4.1.5 Cálculo da raiz do desvio quadrático médio (RMSD)..... 66
4.1.6 Obtenção do complexo scFv-RBD..... 67
4.2 Mapeamento dos resíduos de aminoácidos do paratopo do scFv e caracterização da natureza de interação no reconhecimento do antígeno..... 68
4.2.1 Minimização de energia do complexo antígeno-anticorpo: YASARA... 68
4.2.2 Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presentes na interface do anticorpo scFv: PRODIGY e PISA..... 68
4.2.2.1 PRODIGY: *Protein Binding Energy*..... 69
4.2.2.2 PISA: *Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*..... 69
4.2.3 Caracterização da natureza de interação envolvida no reconhecimento do antígeno pelo anticorpo scFv: PIC..... 69
4.3 Cálculos de mutações sítio-dirigidas: MutateX..... 70
4.4 Simulações de dinâmica molecular..... 72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 74
5.1 Construção do modelo do anticorpo scFv anti-RBD-SARS-CoV-2..... 74
5.2 Processo de otimização do anticorpo scFv-CR3022 e construção de um novo modelo otimizado..... 81
5.2.1 Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presentes na interface do anticorpo scFv-CR3022 e caracterização da natureza de interação envolvida no reconhecimento frente ao antígeno..... 81
5.2.2 Cálculos de mutação sítio-dirigida..... 88
5.2.3 Desenho e construção de um novo modelo de anticorpo scFv otimizado..... 89
5.2.4 Análise do paratopo do anticorpo scFv MAD22 para a estimativa do ganho de interação entre o anticorpo e o antígeno..... 93

5.3 Simulações de dinâmica molecular: métodos ampliados no estudo do comportamento dos anticorpos scFv-CR3022 e scFv MAD22 frente ao antígeno RBD pertencente ao vírus SARS-CoV-2..... 97

CAPÍTULO 2..... 101

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DIRETO DA COVID-19

1 INTRODUÇÃO..... 101

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 102

2.1 Teste de captura de antígeno na detecção da COVID-19..... 102

2.2 *Receptor binding domain* (RBD) como molécula antigênica no diagnóstico da COVID-19..... 104

2.3 Expressão heteróloga em *Escherichia coli* como método de produção de proteínas recombinantes aplicada ao diagnóstico molecular..... 106

3 OBJETIVOS..... 111

3.1 Objetivo geral..... 111

3.2 Objetivos específicos..... 111

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 112

4.1 Escolha do vetor de expressão, clonagem do gene sintético e determinação dos parâmetros físico-químicos atribuídos às proteínas..... 112

4.2 Produção de células competentes usando cloreto de cálcio..... 112

4.3 Transformação de células competentes por meio da técnica de choque térmico..... 113

4.4 Armazenamento de células transformadas em glicerol 20%..... 114

4.5 Minipreparação do dna plasmidial por lise alcalina e SDS..... 114

4.5.1 Preparação da célula bacteriana..... 115

4.5.2 Processo de lise celular para a obtenção do DNA plasmidial..... 115

4.5.3 Recuperação do DNA plasmidial..... 115

4.6 Extração do dna plasmidial utilizando kit comercial: *pureyield™ plasmid miniprep system*..... 116

4.6.1 Etapa de lise celular para a obtenção do DNA plasmidial..... 116

4.6.2 Etapa de lavagem das amostras para remoção de endotoxinas..... 116

4.6.3 Etapa de eluição e armazenamento das amostras..... 117

4.7 Análise de qualidade do DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose 1%..... 117

4.7.1 Preparo do gel de agarose 1% (m/v)..... 117
4.7.2 Montagem da corrida da eletroforese em gel de agarose..... 118
4.7.3 Detecção do DNA plasmidial em gel de agarose..... 118
4.8 Expressão heteróloga dos anticorpos scFv e padronização da metodologia adotada..... 118
4.8.1 Teste de padronização da indução dos anticorpos scFv..... 119
4.8.2 Processamento das amostras: recuperação das proteínas da fração periplasmática..... 119
4.8.3 Processamento das amostras: recuperação das proteínas da fração solúvel..... 119
4.8.4 Processamento das amostras: recuperação das proteínas dos corpos de inclusão..... 120
4.9 Métodos de análises de proteínas: SDS-PAGE e *Western blotting*..... 120
4.9.1 Separação das proteínas recombinantes presentes nas amostras: SDS-PAGE..... 120
4.9.1.1 Preparo do gel de policrilamida 12%..... 121
4.9.1.2 Corrida das amostras em SDS-PAGE..... 121
4.9.1.3 Visualização das bandas de expressão: *Coomassie blue*..... 121
4.9.2 Identificação das proteínas recombinantes presentes nas amostras: *Western blotting*..... 122
4.9.2.1 Etapa de eletrotransferência em sistema semi-seco e bloqueio da membrana..... 122
4.9.2.2 Etapa de incubação com os anticorpos primário e secundário..... 123
4.9.2.3 Etapa de revelação pela a adição de substrato..... 123
4.10 Processo de purificação dos anticorpos scFv-CR3022 e scFv MAD22..... 124
4.11 Etapa de diálise em tampão carbonato das amostras de anticorpos purificados e teste de estabilidade das proteínas..... 124
4.12 Determinação do teor de proteína: espectrofotometria de absorção em 280 nm (A280)..... 125
4.13 Cálculo do rendimento total da proteína..... 125
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 126
5.1 Seleção do vetor de expressão e desenho do gene sintético a ser clonado e utilizado na expressão em sistema bacteriano..... 126
5.2 Transformação do gene sintético em células *E. coli* DH5α competentes, extração do DNA plasmidial e análise de qualidade das amostras..... 128
5.3 Teste de expressão dos anticorpos scFv em célula de *E. coli* BL21(DE3)-Ril competentes..... 130
5.3.1 Teste de indução do Anticorpo scFv-CR3022 nas temperaturas de 15ºC, 25ºC, 30ºC e 37ºC..... 131
5.3.2 Teste de tempo de indução do Anticorpo scFv-CR3022 durante 48h..... 132
5.3.3 Teste de indução do Anticorpo scFv MAD22 nas temperaturas de 15ºC, 25ºC, 30ºC e 37ºC..... 134

5.3.4 Teste de tempo de indução do Anticorpo scFv MAD22 durante 48h..... 135
5.4 Padronização da purificação dos anticorpos scFv-CR3022 e scFv MAD22..... 136
5.5 Teste de diálise e estabilidade dos anticorpos scFv em tampão carbonato 20 mM e cálculo do rendimento das proteínas..... 138
6 PERSPECTIVAS FUTURAS..... 142
CONCLUSÃO FINAL..... 143
REFERÊNCIAS..... 144

APÊNDICES..... 171
A Construção das sequências primárias dos anticorpos scFv utilizados na modelagem por meio do servidor MODELLER 10.1..... 171
B Validação dos modelos de anticorpos scFv construídos pelo método de modelagem comparativa..... 175
C Caracterização da natureza de interação entre os anticorpos scFv e a proteína RBD pelos servidores PIC e PISA..... 180
D Mutações sítio-dirigidas..... 184
E Trabalhos publicados durante o mestrado..... 185

ANEXOS..... 187
A *Scripts*..... 187
B Soluções e tampões..... 189
C Documentos referentes ao controle de qualidade dos genes clonados disponibilizados pela empresa WatsonBio Sciences..... 194
D Cromatogramas gerados durante a purificação dos anticorpos scFv recombinantes..... 196

1 INTRODUÇÃO GERAL

No final de 2019, um surto de pneumonia de origem desconhecida se alastrou pela província de Hubei, localizada na China Continental, sendo reportada no mesmo mês à Organização Mundial da Saúde (OMS). Em janeiro de 2020, pesquisadores isolaram e idenficaram o organismo responsável pela doença, classificando-o como SARS-CoV-2, pertencente ao gênero β-coronavirus, o qual se assemelha em 79,6% do seu gênoma com o do vírus SARS-CoV, causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), e nomearam a doença como COVID-19 (HARAPAN *et al*., 2020; HU *et al*., 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus esférico formado por um núcleo de RNA de fita simples, o qual codifica quatro proteínas responsáveis pela montagem de sua estrutura: proteína nucleocapsídeo (N), proteína membrana (M), proteína do envelope (E) e a proteína *spike* (S) (JIN *et al*., 2020). A proteína S se subdivide nas unidades S1 e S2, sendo a primeira responsável por interagir com a célula do hospedeiro e a última por auxiliar no processo de infecção viral (MARIANO *et al*., 2020). Normalmente, a forma de transmissão mais comum da COVID-19 ocorre por meio das vias respiratórias, onde o vírus se aloja no epitélio pulmonar do hospedeiro e inicia o seu processo de replicação. Nessa etapa, o indivíduo pode permanecer assintomático ou gerar uma resposta exarcerbada do sistema imune, podendo levar o doente ao óbito (WIERSINGA *et al*., 2020).

Com o avanço da disseminação da COVID-19 pelo mundo se fez necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis para diagnosticar e isolar indivíduos doentes daqueles saudáveis, com o intuito de promover o controle da doença (ZALZALA, 2020). Entretando, o padrão ouro utilizado para confirmar a infecção pelo SARS-CoV-2, realizado por meio da técnica de RT-PCR, ainda é inacessível para a testagem geral da população devido ao alto custo embutido e a necessidade de mão de obra qualificada (SCOHY *et al*., 2020). Métodos menos acurados são empregados para auxiliar no rastreio da doença como os testes rápidos sorológicos, a tomografia computadorizada de tórax, exames de marcadores bioquímicos, hemograma, leucograma e o histórico clínico apresentado pelo paciente (IYER *et al*., 2020).

Com base no que foi exposto, o desenvolvimento de tecnologias de modo racional, utilizando ferramentas de biofísica computacional em conjunto com a produção *in vitro* do insumo torna-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos testes mais baratos e acurados para auxiliar no combate da COVID-19.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *CORONAVIRUS DISEASE 2019* (COVID-19): ORIGEM E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

No dia 08 de dezembro de 2019, um grupo de pacientes apresentando sintomatologia característica de pneumonia, com etiologia desconhecida, deram entrada no hospital em Wuhan, localizado na província de Hubei, a 7ª cidade mais populosa da China Continental (HARAPAN *et al*., 2020; HU *et al*., 2020). Exames clínicos, laboratoriais e radiológicos realizados mostraram a presença de febre, linfocitopenia, leucocitopenia, infiltrado pulmonar e ineficácia a antibioticoterapia, hipotetizando uma nova pneumonia de origem viral (JIN *et al*., 2020; WU *et al*., 2020c; ZHOU *et al*., 2020).

A rápida disseminação da doença pelas áreas de Wuhan levaram as autoridades sanitárias chinesas a notificar à Organização Mundial da Saúde (OMS) no dia 31 de dezembro daquele mesmo mês sobre uma nova pneumonia de etiologia desconhecida e de interesse internacional, a qual emergia no país (WU *et al*., 2020b; YUKI *et al*., 2020).

Logo no início de 2020, pesquisadores chineses foram capazes de isolar o possível agente causador da doença a partir de amostras de lavagem broncoalveolar coletadas de paciente apresentando pneumonia grave, submetendo-o ao sequenciamento do material genômico para a caracterização do organismo (WU *et al*., 2020a). No dia 7 de janeiro, os cientistas identificaram esse novo patógeno como pertencente à família Coronaviridae, sendo anunciado publicamente pelo governo Chinês no dia 9 de Janeiro, No dia seguinte, o esboço do genoma viral (WH-Human_1) havia sido publicado no site *virological.org* para fornecer auxilio nas medidas adotadas pelas agências de saúde global, e, no dia 12 de janeiro, quatro novos genomas já haviam sidos depositados no banco de dados *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) (HU *et al*., 2020; MALIK, 2020; ZHENG, 2020). Com base em análises das sequências em relação a outros vírus, a OMS nomeou esse novo vírus como 2019n-CoV (*2019 novel CoV*) (HARAPAN *et al*., 2020; MEO *et al*., 2020).

No dia 11 de Fevereiro de 2020 o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus decretou o nome oficial desse novo patógeno como SARS-CoV-2 (do inglês *sereve acute respiratory syndrome coronavirus 2*), devido a 79,6% de identidade apresentada por sua sequência genômica quando alinhada à do SARS-CoV (do inglês *sereve acute respiratory*

syndrome coronavirus), responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) ocorrida no ano de 2002-2003. e no mesmo dia, a OMS classificou a doença como *Coronavírus disease* 2019 (COVID-19). No dia 11 de março de 2020, a OMS declarou oficialmente a COVID-19 como pandemia (HSU *et al*., 2020; HU *et al*., 2020; ZHOU *et al*., 2020).

A taxa em que uma pessoa infectada pode transmitir o vírus para outra saudável (R0), inicialmente foi calculada pela OMS como valores entre 1,4 a 2,4, sendo que R0 ≥ 1 indica que a doença é altamente contagiosa. Porém, estudos realizados por Rabi *et al*. (2020), demonstraram que estes valores se encontravam entre 2,24 a 3,58. Essa diferença se deve ao caráter epidemiológico da região observada, podendo variar de acordo com as medidas sanitárias adotadas pelo governo local. Entretanto, apesar desse novo coronavirus ser facilmente dispersado e virulento, sua taxa de letalidade permanece baixa em relação aos outros vírus pertencentes à mesma família, apresentando apenas 4.94% de óbitos entre os infectados, em comparação ao SARS-CoV (2002-2003) o qual mostrava 9.56% de mortalidade e ao MERS-CoV (do inglês *middle east respiratory syndrome coronavirus*) (2012-2013) com 34.40% de mortalidade (RABI *et al*., 2020; SAMUDRALA et al., 2020; SHETTY et al., 2020).

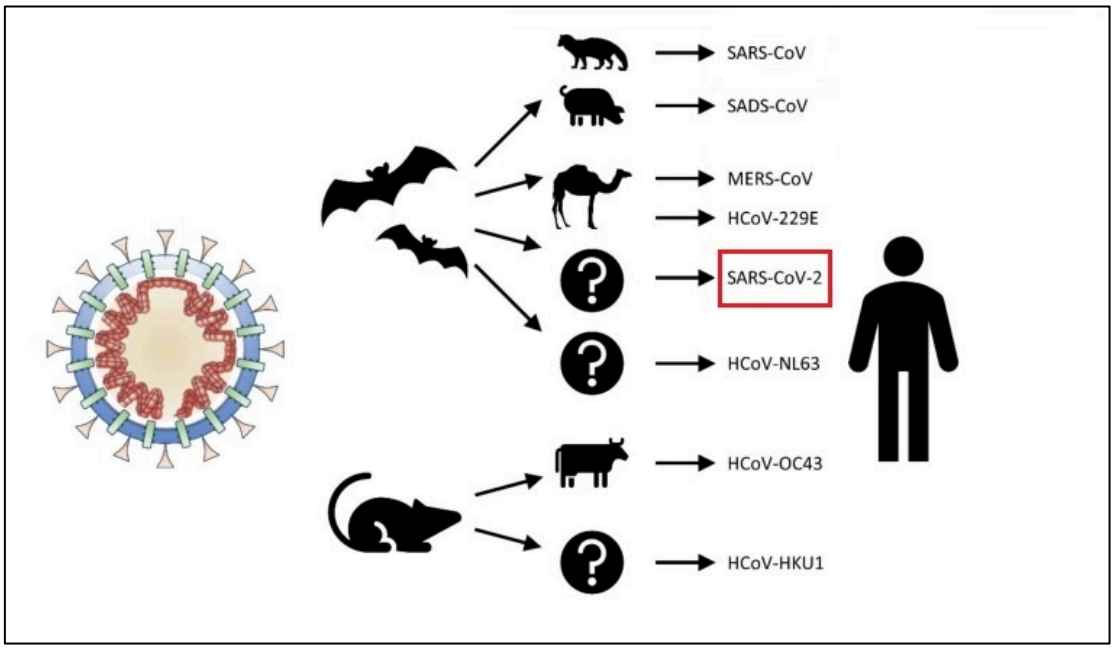
2.2 A FAMÍLIA CORONAVÍRUS: ASPECTOS GERAIS

A descoberta dos primeiros coronavírus humanos (HCoV) remetem ao ano de 1960, sendo organismos pertencentes à família Coronaviridae, maior família da ordem Nidovirales, e conhecidos por infectar humanos, pássaros, morcegos, cobras, ratos, girafas, baleias e outros animais selvagens. Além disso, os coronavírus também infectam rebanhos (SADS-CoV do inglês s*wine acute diarrhea syndrome coronavirus*) e animais domésticos, onde estes podem desempenhar papel de hospedeiros intermediários, permitindo a transmissão do vírus para outros animais selvagens e desses para o ser humano. A família Coronaviridae se subdivide em duas famílias: Torovirinae e Orthocoronavirinae, a qual inclui quatro gêneros (α-coronavirus, β-coronavirus, γ-coronavirus e δ-coronavirus) (Figura 1) (ASHOUR *et al*., 2020; EDWARDS *et al*., 2020; FUNG *et al*., 2020; HASÖKSÜZ *et al*., 2020; RABI *et al*., 2020)..

Desde meados dos anos 60, quatro HCoV endêmicos, reconhecidos como HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 são responsáveis por causar cerca de um terço das doenças que acometem o trato respiratório superior de forma branda. Entretanto, esse

cenário se agravou no início do século XXI com o surto da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS do inglês *severe acute respiratory syndrome*, ou SRAG, em português) na China causado pelo coronavírus SARS-CoV nos anos de 2002-2003, sendo a transmissão desse vírus ao ser humano ocorrida por intermédio de um mamífero chamado Civeta. Mais tarde, nos anos de 2012-2013 na Arábia Saudita, ocorre a explosão da Síndrome Respiratória do Oriente Médio causada pelo coronavírus MERS-CoV transmitido ao ser humano por meio do contato com camelos infectados (ANDERSEN *et al*., 2020; FEHR *et al*., 2017; LIU *et al*., 2020; LUDWIG *et al*., 2020; MEO *et al*., 2020; WU *et al*., 2020a; YANG *et al*., 2020). Atualmente, não se sabe ao certo a origem zoonótica da transmissão do SARS-CoV-2 ou se esse originou apenas do contato de pessoa para pessoa, fazendo com que diversas hipóteses estejam sendo estudadas pelos pesquisadores (Figura 1) (LYTRAS *et al*., 2021).

Figura 1 - Origem zoonótica de alguns coronavirus humanos (HCoV).



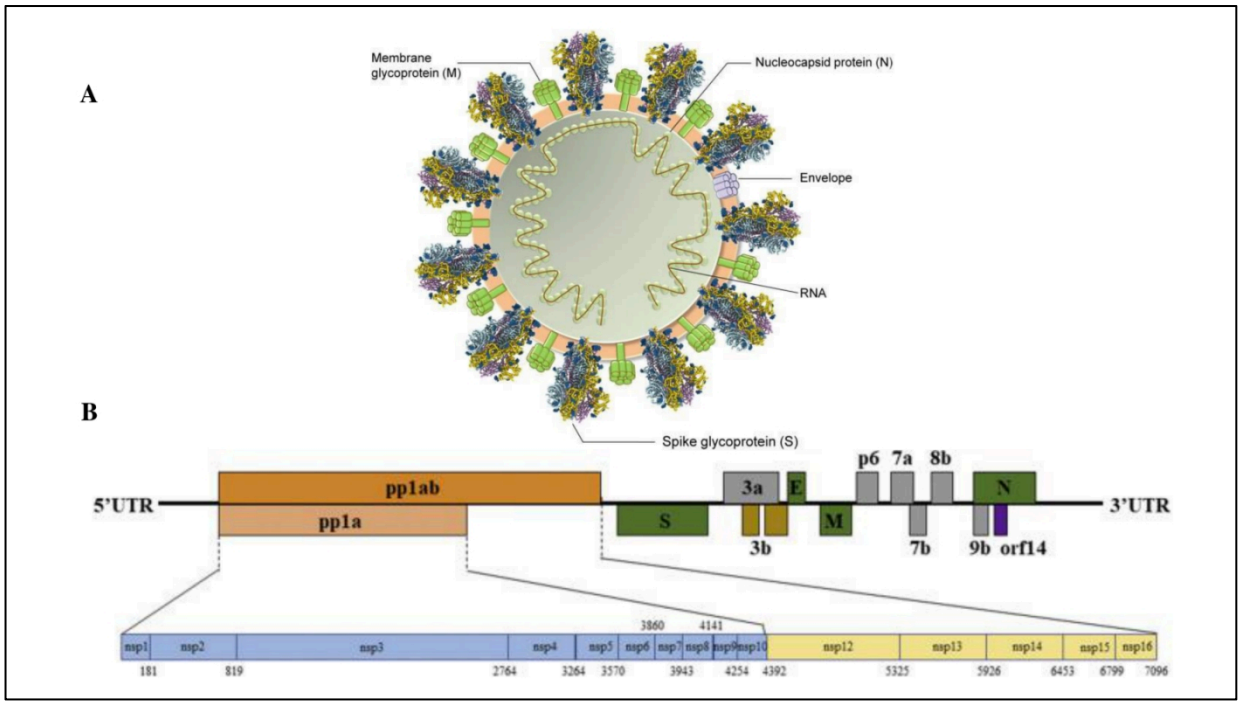
A caixa vermelha destaca o novo β-coronavirus SARS-CoV-2, o qual ainda não se sabe ao certo sua origem zoonótica. **Fonte**: Adaptado de RABI *et al*., (2020).

2.2.1 Morfologia do SARS-CoV-2 e organização do genoma viral

Estudos referentes à morfologia viral obtidos por imagens de microscopia eletrônica demonstraram que, assim como outros vírus pertencentes ao gênero β-coronavirus, o SARS-CoV-2 possui formato esférico, podendo variar de 60 a 100 nm de diâmetro (Figura 2a). O

genoma do vírus é formado por uma molécula de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) com aproximadamente 26 a 32 kb (JIN *et al*., 2020; KUMAR *et al*., 2020; ZHENG, 2020; GRUDLEWSKA-BUDA *et al*., 2021).

Figura 2 - Estrutura e organização genômica do vírus SARS-CoV-2.



(A) Morfologia e distribuição das proteínas estruturais do vírus: proteína nucleocapsídeo (N), proteína membrana (M), proteína do envelope (E) e proteína *spike* (S). **(B)** Organização do genoma viral. **Fonte:** Adaptado de KUMAR *et al*. (2020); YANG *et al*. (2020).

A região 5' do genoma é composto pelos quadros abertos de leitura (ORFs, do inglês *open read frames*) 1a e 1ab, sendo o gene ORF1a responsável por codificar as proteínas pp1a que contém 10 proteínas não estruturais chamadas nsps (do inglês *non-structural proteins*) (nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8, nsp9 e nsp10), e o gene ORF1ab codifica para a proteína pp1ab, a qual compreende além das nsps de 1-10 outras cinco proteínas não estruturais (nsp12, nsp13, nsp14, nsp15 e nsp16). Por outro lado, a região terminal 3' do genoma codifica para quatro proteínas estruturais denominadas proteína nucleocapsídeo (N), proteína membrana (M), proteína do envelope (E) e a proteína *spike* (S). Além dessas moléculas, o genoma do SARS-CoV-2 também apresenta oito proteínas acessórias: 3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b e ORF14 (Figura 2b) (MALIK, 2020; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; YANG *et al*., 2020).

2.2.1.1 *Proteína Nucleocapsídeo (N)*

Ligado a molécula de RNA no interior do vírus, o SARS-CoV-2 apresenta uma proteína denominada nucleocapsídeo (N) composta por 419 resíduos de aminoácidos com aproximadamente 45,6 kDa. Essa molécula é altamente imunogênica, essencial para os processos de transcrição e tradução da partícula viral e modulação das respostas imunes do hospedeiro. Estudos demonstraram que a proteína consiste em um domínio N-terminal (NTD) rico em fitas β e responsável pela ligação do RNA com uma alça central de Ser e Arg que se conecta a um domínio C-terminal (CTD) também formado por β-strands e algumas hélices (CUBUK *et al*., 2020; KANG *et al*., 2020a; ZENG *et al*., 2020; GAO *et al*., 2021).

2.2.1.2 *Proteína Membrana (M)*

A montagem da estrutura viral é dirigida principalmente pela proteína M, expressa na bicamada lipídica. Disposta na forma de dímero, essa proteína apresenta variações em seu correspondente peso molecular, de 25 a 30 kDa. A modelagem estrutural e análises da sequência primária da proteína demonstrou que essa é formada por um tripla hélice e três domínios transmembrana, um ectodomínio N-terminal glicosilado que apresentou uma pequena inserção de um resíduo Ser entre as espécies e um endodomínio C-terminal com aproximadamente 3-8 nm de comprimento, assemelhando-se a um transportador de açúcar encontrado em procariotos. Deste modo, pesquisadores hipotetizaram que a proteína M influencia na glicosilação da proteína S e também auxilia no processo de proliferação, replicação e evasão do sistema imune, sendo necessário experimentos *in vitro* para validação e compreensão desses mecanismos. Devido à sua abundância na partícula viral, análises de similaridade usando ferramentas de bioinformática foram aplicadas para comparar a sequência primária da proteína M do SARS-CoV-2 com a de outros CoVs encontrados em morcegos e pangolins. A análise demonstrou uma alta taxa de conservação entre eles, com cerca de 98% de identidade (BIANCHI *et al*., 2020; HASÖKSÜZ *et al*., 2020; KUMAR *et al*., 2020; MALIK, 2020; THOMAS, 2020).

2.2.1.3 *Proteína do Envelope (E)*

A proteína E é um dos menores polipeptídeos encontrados ancorados na bicamada lipídica do SARS-CoV-2, sendo formada por aproximadamente 76 resíduos de aminoácidos e

com massa molecular variando de 8 a 12 kDa. Estudos a respeito de sua funcionalidade demonstraram a participação dessa proteína no processo de infecção, patogênese, ciclo viral e recrutamento do sistema imunológico do hospedeiro. Estruturalmente, a proteína E possui três domínios principais, podendo adotar formato monomérico ou oligomerizar para formar um canal iônico homopentamérico. O ectodomínio N-terminal é composto por uma curta sequência de resíduos de aminoácidos e possui características hidrofílicas. O domínio hidrofóbico transmembranar compreende aproximadamente 25 resíduos e é responsável pela formação do canal condutor de íons que tem sua atividade modulada pelo potencial da membrana lipídica viral. O endodomínio C-terminal contém o motivo de ligação à proteína PALS1 da célula hospedeira, auxiliando na patogênese do vírus (PERVUSHIN *et al*., 2009; BIANCHI *et al*., 2020; GUPTA *et al*., HASSAN *et al*., 2020; MALIK, 2020).

2.2.1.4 *Proteína Spike (S)*

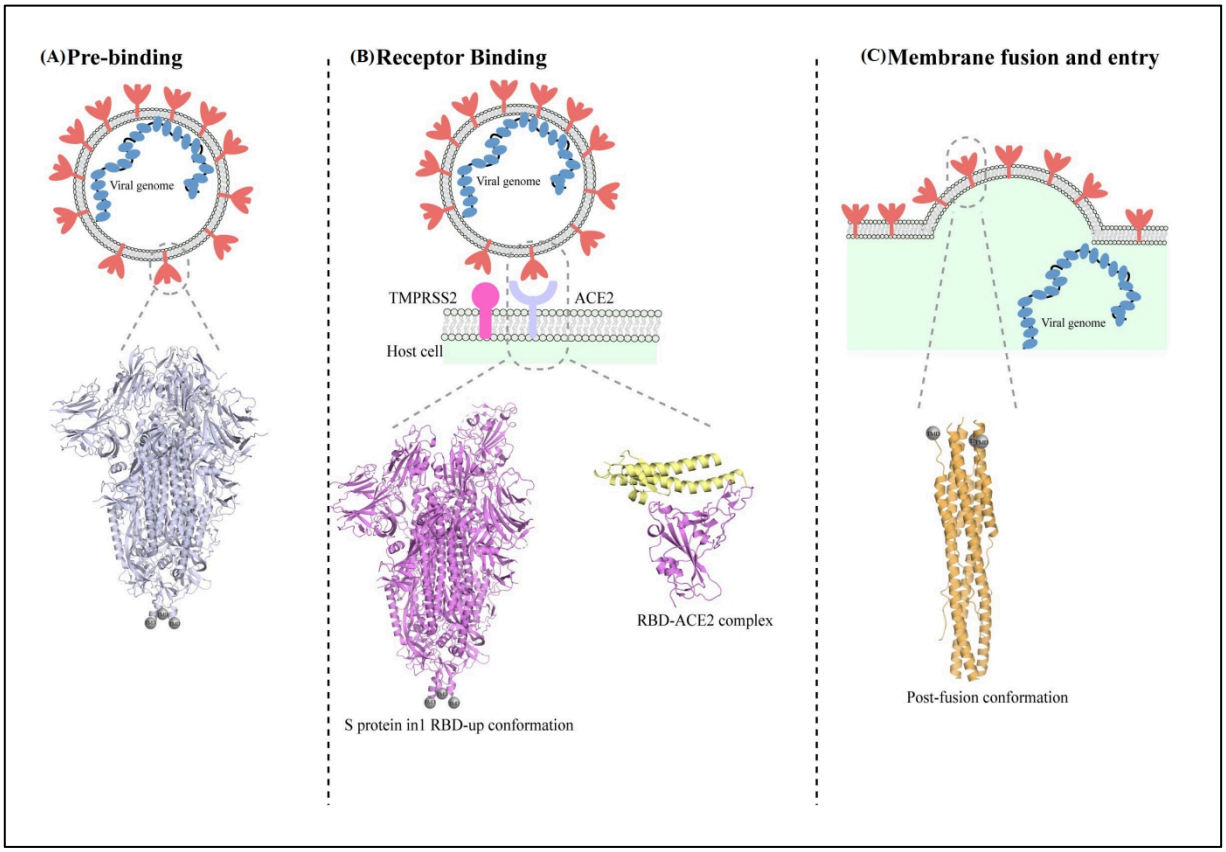
A proteína *Spike* (S) é uma glicoproteína homotrimérica classe I e a quarta proteína de membrana codificada pelo genoma do SARS-CoV-2. Cada monômero apresenta aproximadamente 180 kDa e são divididos em duas porções funcionais: a subunidade S1 e a subunidade S2, responsáveis pela ligação e infecção da célula do hospedeiro mediada pelo receptor ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) (INFANTINO *et al*., 2020; MARIANO *et al*., 2020; OU *et al*., 2020).

A subunidade S1 possui aproximadamente 70% de identidade entre sua sequência primária e a sequência de outros vírus pertencentes à família coronavírus que infectam humanos e interage com o receptor ECA2 por meio do domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *receptor binding domain*), além de auxiliar na estabilidade conformacional da subunidade S2. Por outro lado, a subunidade S2 é responsável por promover a fusão entre a membrana viral e a membrana da célula hospedeira, dando início ao processo de infecção pelo SARS-CoV-2 (Figura 3) (AMANAT *et al*., 2020; KUMAR *et al*., 2020; MALIK, 2020).

A ativação da proteína S é dependente de uma clivagem proteolítica entre as subunidades S1/S2 promovida por serino proteases denominadas TMPRSS2 e por cisteíno proteases, as catepsinas B e L, levando a um estado de perfusão da subunidade S2 estabilizado pela subunidade S1. As catepsinas são vistas como clivagens adicionais, não efetuando papel principal na infecção da célula pelo vírus. Além disso, o SARS-CoV-2 apresenta um sítio polibásico formado por resíduos de prolina, arginina e alanina (PRRAR) na junção S1 e S2, o

qual permite ser clivado por furinas (ANDERSEN *et al*., 2020; HOFFMANN *et al*., 2020; MATSUYAMA *et al*., 2020; WALLS *et al*., 2020).

Figura 3 - Ativação da proteína S do SARS-CoV-2.



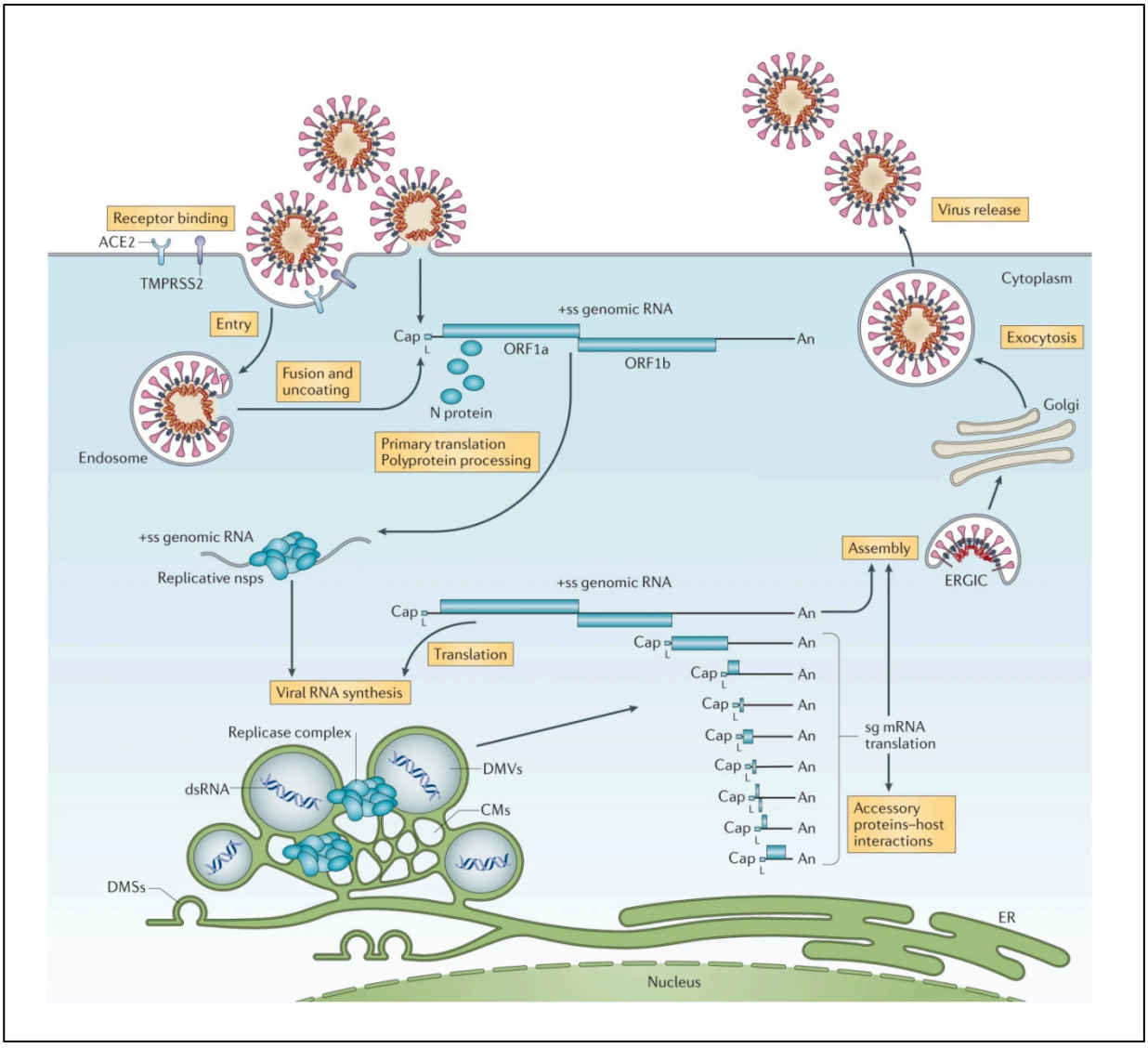
(A) A fase inicial envolve o ajuste conformacional do domínio de ligação ao receptor (RBD) localizado na subunidade S1 da proteína. **(B)** Após a interação com o receptor ECA2, a junção entre a subunidade S1 e S2 é clivada pela proteína TMPRSS2 presente na célula hospedeira. **(C)** A subunidade S2 promove a fusão da membrana do vírus com o da célula hospedeira iniciando o processo de replicação viral. ACE2: *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2). **Fonte**: Adaptado de MARIANO *et al*. (2020).

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO SARS-CoV-2

O processo de replicação viral tem início após a interação da proteína S com o receptor ECA2, como descrito anteriormente. Essa enzima atua no sistema renina-angiotensina promovendo a clivagem da angiotensina II em angiotensina 1-7. Além da alta expressão na membrana de pneumócitos, principalmente do tipo II, essa proteína também está presente no coração, rim e no trato gastrointestinal, indicando o efeito sistêmico causado pela infecção por SARS-CoV-2. Estudos sugerem que a afinidade do novo coronavírus pelo receptor pode

chegar de 10 a 20 vezes maior do que visto para o SARS-CoV (HASÖKSÜZ *et al*., 2020; GHEBLAWI *et al*., 2020; GUO *et al*., 2020). A figura 4 ilustra o processo pelo qual ocorre a formação de novas partículas virais.

Figura 4 - Ciclo de replicação do SARS-CoV-2.



Esquema representativo envolvendo as principas etapas do ciclo de replicação do SARS-CoV-2 e a montagem de uma nova partícula viral. Cap: 5' cap; An: 3' PoliA; ACE2: *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2). **Fonte**: Adaptado de V'KOVSKI *et al*. (2020).

Após a fusão da membrana viral com a membrana do hospedeiro, ocorre a liberação do material genético do vírus no citosol da célula infectada, fenômeno denominado desnudamento. Com o RNA viral presente no interior da célula do hospedeiro tem-se início o processo de replicação e formação de novas partículas virais. Os genes ORF1a e ORF1ab

então são traduzidos à poliproteínas pp1a e pp1ab respectivamente por meio de um mecanismo de deslocamento de quadros, sendo posteriormente clivadas por proteases internas em 15 proteínas não estruturais (nsps), formando o complexo de replicação-transcrição viral, o qual sintetiza fitas negativas de RNA genômico e promove a transcrição de mRNA subgenômico. As fitas negativas de RNA genômico são utilizadas para a produção de uma nova molécula de RNA, por outro lado as moléculas de RNAs subgenômico são necessários para a síntese de proteínas estruturais e acessórias do vírus (ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; SAMUDRALA *et al*., 2020). As vesículas nucleares de membrana dupla (DMVs, do inglês *double-membrane vesicles*), as membranas convolutas (CMs, do inglês *convoluted membranes*) e as esférulas de membrana dupla aberta (DMSs, do inglês *open double-membrane spherules*) do retículo endoplasmático formam um ambiente protetor para a replicação do RNA genômico viral e transcrição dos mRNAs subgenômicos (V'KOVSKI *et al*., 2020).

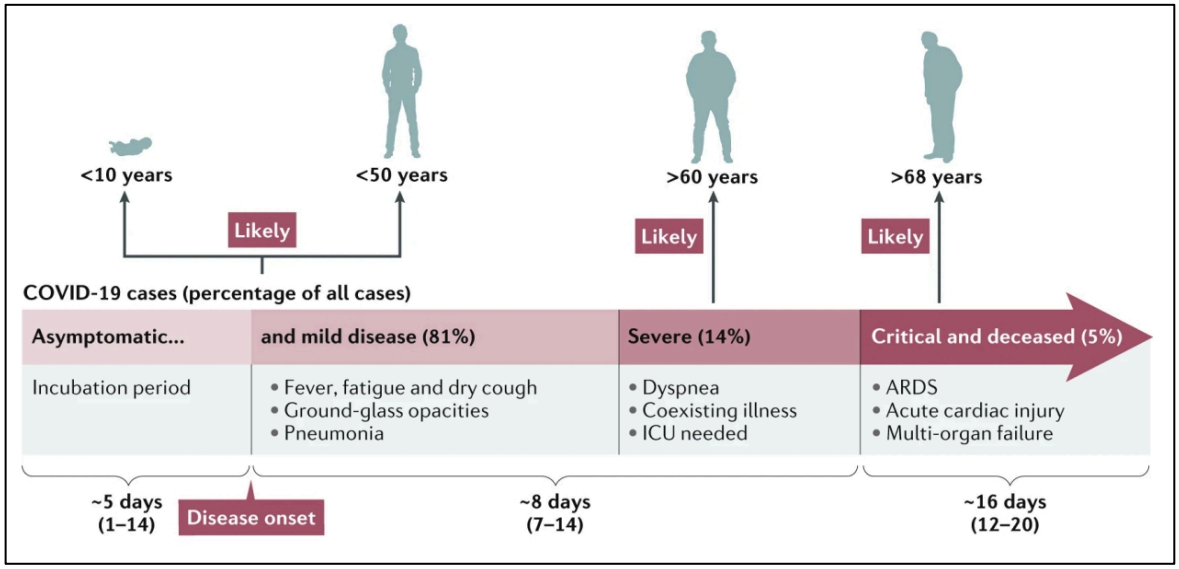
No processo final da montagem de uma nova partícula viral, as proteínas estruturais codificadas a partir da porção 3' do genoma são expressas na membrana do retículo endoplasmático da célula infectada. A proteína nucleocapsídeo se liga ao RNA genômico em uma estrutura helicoidal e logo após é levada para o compartimento intermediário entre o complexo de golgi e o retículo endoplasmático (ERGIC, do inglês *endoplasmic reticulum - golgi intermediate compartment*) resultando na formação de um novo virion. Após este processo, os vírions são incorporados a vesículas e liberados das células por exocitose (ROMANO *et al*., 2020; SIMABUCO *et al*., 2021).

2.4 PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS DA COVID-19: RESPOSTA IMUNOLÓGICA FRENTE A INFECÇÃO PELO SARS-CoV-2

A forma mais comum de contrair a COVID-19 ocorre pelo sistema respiratório, por meio da exposição de pessoas sadias a gotículas provenientes da respiração ou espirro de pessoas infectadas. O vírus se aloja no epitélio da mucosa do trato respiratório superior onde inicia sua replicação, alcançando então o trato respiratório inferior, dando início a multiplicação. Neste processo o hospedeiro pode permanecer na forma assintomática, onde há o controle da infecção promovida pelo sistema imune inato, ou desencadear uma resposta imune exacerbada, levando ao surgimento de sintomas moderados a graves, podendo resultar em insuficiência respiratória e falência múltipla de órgãos (PARASHER, 2020; WIERSINGA

et al., 2020). A figura 5 representa de forma didática os sintomas mais comuns observados em pacientes de acordo com sua faixa etária. Entretanto, essa linearidade nem sempre está presente. Indivíduos jovens também podem desenvolver casos graves da doença (ORTIZ-PRADO *et al*., 2020).

Figura 5 - Sintomatologia da COVID-19 de acordo com a faixa etária.



Principais sintomas característicos de cada fase da doença considerando a faixa hetária do paciente em relação ao tempo de infecção pelo SARS-CoV-2. ICU: *Intensive Care Unit* (Unidade de Tratamento Intensivo); ARDS: *Acute Respiratory Distress Syndrome* (Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo). **Fonte**: Adaptado de ORTIZ-PRADO *et al*. (2020).

O sistema imune inato, primeira via de resposta ativada frente a infecção pelo SARS-CoV-2, leva a produção de interferons do tipo I e III, os quais apresentam atividade antiviral da célula do hospedeiro, além do recrutamento de células NKs, macrófagos e neutrófilos promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-33, IFN-α, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, G-CSF, MCP-1, MIP-1A, e também de quimiocinas, sendo as principais a CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, processo chamado “chuva de citocinas”. A produção de IL-1β madura ocorre por meio da proteólise da pró-IL-1β mediada pela caspase 1, cuja ativação necessita da formação de um complexo denominado inflamassoma, via que pode ser regulada pelo SARS-CoV-2 (FUNG *et al*., 2020; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; SAMUDRALA *et al*., 2020; YANG et al., 2020; YUKI *et al*., 2020). A presença de uma alta expressão de citocinas e quimiocinas culminam

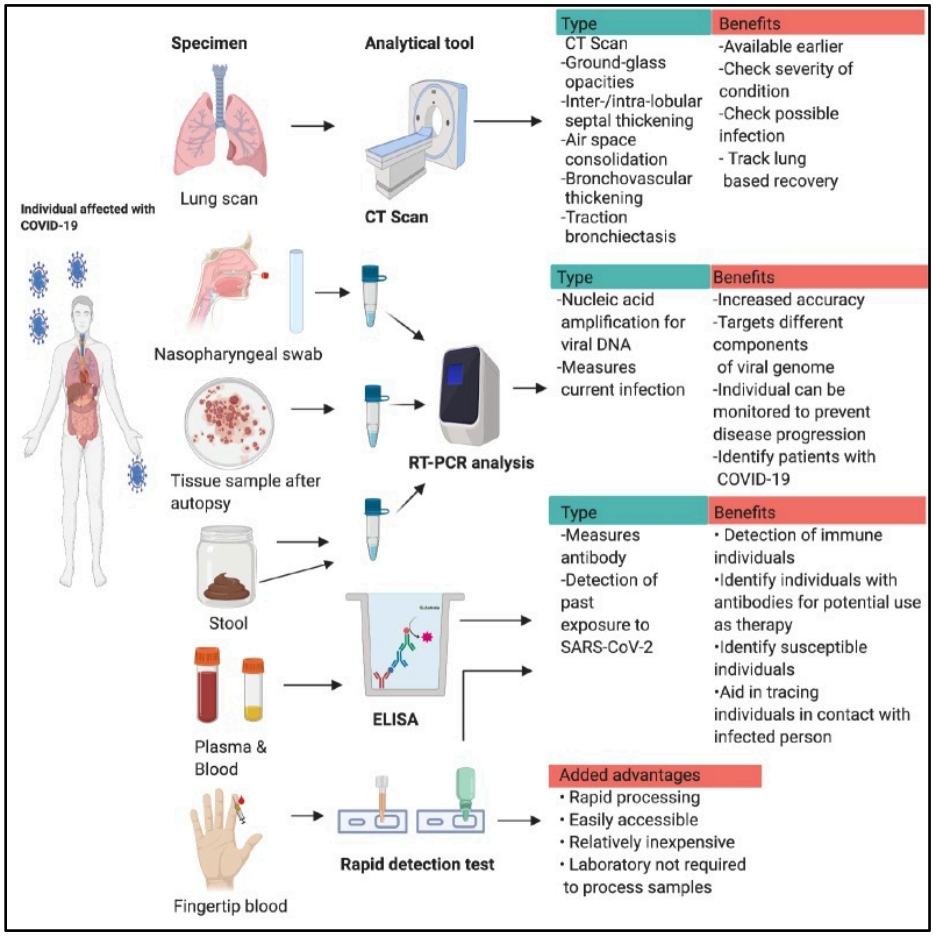
em danos nas células epiteliais podendo alcançar a corrente sanguínea e causar injúrias a outros órgãos, agravando o estado da doença (HU *et al*., 2020; SAMUDRALA *et al*., 2020).

A segunda via de resposta ativada durante o processo de infecção pelo vírus causador da COVID-19 está relacionada ao sistema imune adaptativo. Observa-se declínio da contagem de linfócitos $CD4^+$ maduros e de memória e um aumento no números de células T *naïve* em pacientes em estado grave. Há também o aumento de anticorpos IgG e IgM contra as principais proteínas antigênicas do SARS-CoV-2 (proteína S e N) por volta dos dias 7-10 a partir do surgimento dos primeiros sintomas, este aumento de anticorpos coincide com a diminuição da carga viral do paciente. Entretanto, a presença de anticorpos não é sinônimo de imunidade ao vírus, tendo em visto que nem todas as imunoglobulinas produzidas contra o SARS-CoV-2 são neutralizantes, podendo ocorrer casos de reinfecções (CATANZARO *et al*., 2020; JIN *et al*., 2020; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; VABRET *et al*., 2020; WIERSINGA *et al*., 2020).

2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA COVID-19

Devido ao aumento das notificações da COVID-19 entre os continentes, o diagnóstico rápido e preciso torna-se uma ferramenta de grande importância na prevenção, rastreio e controle da doença, fazendo com que a Organização Mundial da Saúde recomende algumas metodologias capazes de identificar o processo de infecção de forma direta ou indireta. As amostras utilizadas nesses testes normalmente são coletadas do trato respiratório do paciente, como amostras de swab da região da nasofaringe, saliva ou a partir de outros materiais biológicos, como escarro, aspirado endotraqueal, lavagem broncoalveolar, sangue, fezes ou até mesmo tecido pulmonar (Figura 6) (HU *et al*., 2020; IYER *et al*., 2020). Até o presente momento, o padrão ouro recomendado pela OMS para a confirmação de casos relacionados a COVID-19 é o método de RT-PCR. Entretanto, testes rápidos sorológicos foram aprovados pelas agências de saúde com o objetivo de auxiliar na triagem de pacientes suspeitos de forma mais rápida e *in loco*. Além disso, diagnósticos por imagem, como a tomografia computadorizada de tórax, exames de marcadores bioquímicos, hemograma e leucograma, são utilizados, em conjunto com o histórico clínico apresentado pelo paciente, no rastreio e controle epidemiológico da doença (IYER *et al*., 2020; JIN *et al*., 2020; ZALZALA, 2020).

Figura 6 - Métodos de triagem e diagnóstico da COVID-19.



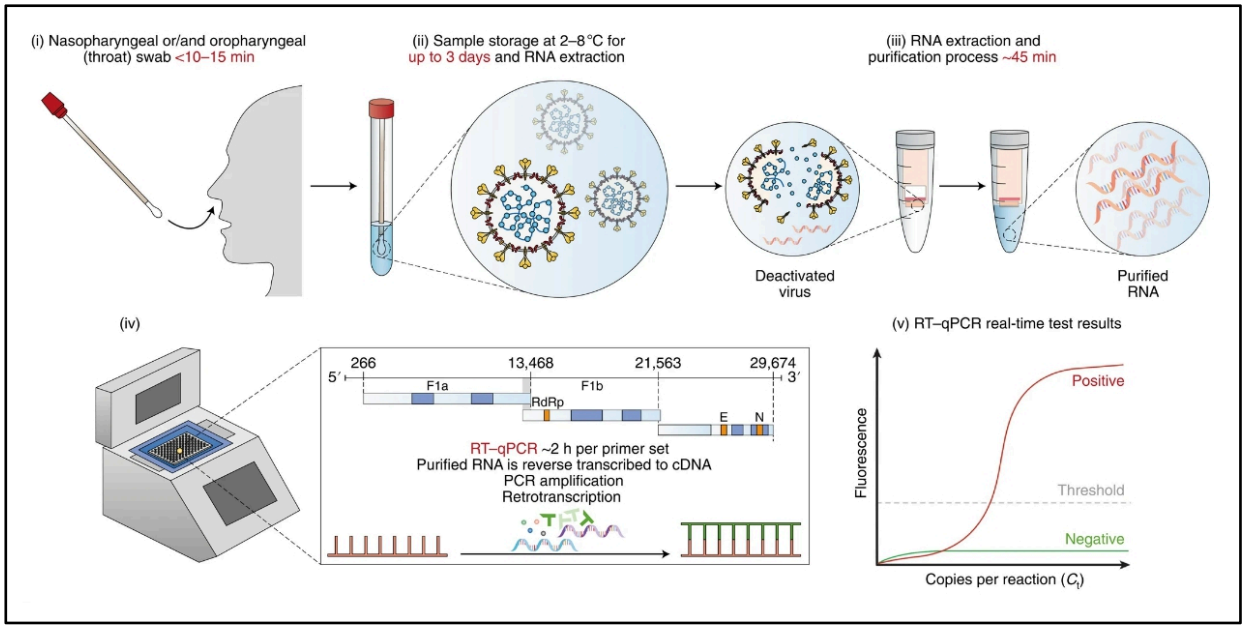
Apesar do único método capaz de confirmar a presença do SARS-CoV-2 em amostras biológicas ainda se basear na técnica de RT-PCR, outras metodologias desenvolvidas e recomendadas pela OMS são rotineiramente empregadas na triagem e rastreio dos doentes. A tomografia computadorizada de tórax é utilizada para vizualisar danos característicos de infecção pelo novo coronavírus, como as chamadas opacidades em vidro fosco. Métodos indiretos como, o ELISA e testes rápidos, podem ser empregados para detectar anticorpos produzidos devido a exposição ao SARS-CoV-2. **Fonte**: IYER *et al*. (2020).

2.5.1 Diagnóstico por Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT - PCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT – PCR) é o padrão ouro recomendado pela OMS para o diagnóstico de pacientes portadores do vírus causador da COVID-19. Essa técnica analisa a presença do material genético viral por meio da amplificação de regiões específicas da molécula contida em amostras coletadas de pacientes suspeitos, sendo os mais comuns, material de swab coletado da região da nasofaringe e amostras de saliva (BWIRE *et al*., 2020; IYER *et al*., 2020). A figura 7 mostra de forma

simplificada as principais etapas envolvidas no processo de diagnóstico e o tempo estimado para a realização de cada etapa.

Figura 7 - Esquema ilustrado do método de diagnóstico da COVID-19 por RT – PCR.



(i) A amostra é coletado da região da naso ou orofaringe por meio do swab. (ii) O material pode ser armazenado sob refrigeração em até 3 dias ou (iii) o material genético pode ser extraído e purificado para a realização da amplificação de parte do RNA genômico viral. (iv) Nesta etapa é feita a transcrição reversa onde o RNA é transcrito em DNA complementar (cDNA) que então é amplificado por meio do uso de um conjunto de *primers*. (v) Os resultados obtidos são representados em um gráfico. **Fonte**: Adaptado de KEVADIYA *et al*. (2021).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) desenvolveu um protocolo padrão para o método de diagnóstico por meio de RT–PCR o qual utiliza três *primers*, sendo um para a detecção de vírus pertencentes à família coronavirus, e os outros dois específicos para SARS-CoV-2. *Primers*, ou iniciadores, são regiões específicas do material genético onde delimitam a amplificação da molécula que desejamos analisar (ZALZALA, 2020).

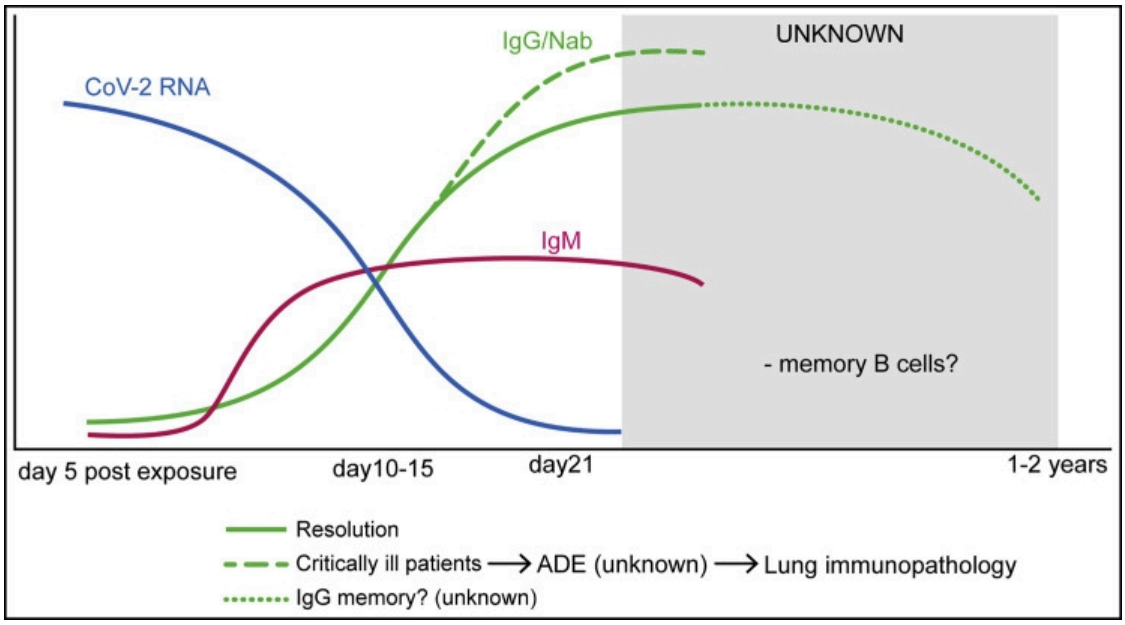
Mesmo a RT-PCR sendo considerada o padrão ouro de análise, resultados negativos para a presença do vírus não excluem a possibilidade do paciente ser portador do vírus, sendo necessário o uso de técnicas auxiliares. A baixa qualidade das amostras, assim como a limitação de seu volume para a análise, a coleta precoce ou tardia do material, e ainda o descuido com o armazenamento podem enviesar o exame realizado, levando a resultados

duvidosos. Além disso, a complexidade do método requer profissionais qualificados para a realização dos testes, e essa, somada aos insumos, quase sempre importados, necessários para o funcionamento da RT–PCR, encarecem o diagnóstico. O período entre a coleta do material e a liberação dos resultados obtidos pelo método também se apresenta como desvantagem, onde esse tempo pode estender por vários dias (LONG *et al*., 2020; SAMUDRALA *et al*., 2020; WIERSINGA *et al*., 2020).

2.5.2 Teste rápido sorológico

Os testes rápidos sorológicos são ensaios imunocromatográficos utilizados para detectar a presença de anticorpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 em amostras de soro ou sangue de pacientes suspeitos. Essas imunoglobulinas são produzidas em resposta à infecção pelo SARS-CoV-2 contra as duas principais estruturas imunogênicas do vírus: a proteína N e a proteína S. A presença de IgM é considerado como um indicativo para processos de infecção aguda, ou seja, período onde ocorre a replicação viral e infecções de novas células, enquanto a detecção de anticorpos IgG sinaliza para infecções mais tardias ou até mesmo prévias (Figura 8) (MOURA *et al*., 2020; ZALZALA, 2020).

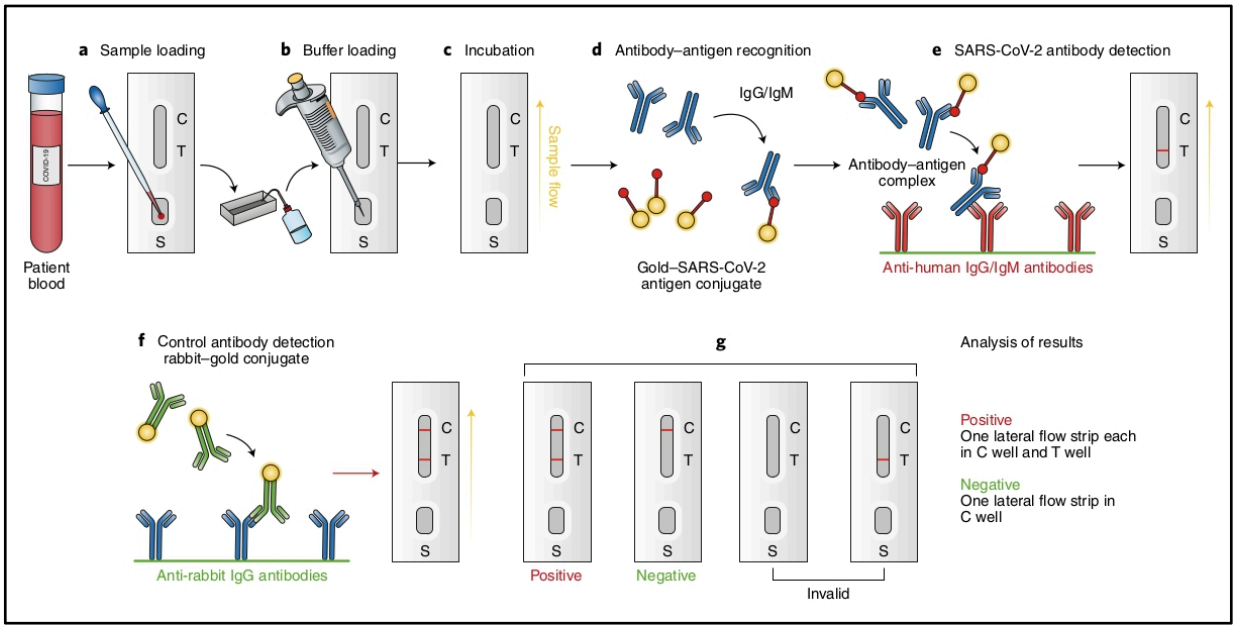
Figura 8 - Produção de IgM e IgG de acordo com o tempo de infecção pelo SARS-CoV-2.



Observa-se que presença do RNA viral (linha azul) é inversamente proporcional ao aumento da presença de IgG (linha verde), simbolizando um processo resolutivo da doença. A produção de anticorpos aparece após o 4º-7º dia, para IgM, e do 14º dia para IgG. **Fonte**: VABRET *et al*. (2020).

A vantagem apresentada pelo uso do método é o fácil manuseio do dispositivo, não necessitando de mão de obra qualificada, e sua aplicação fora de ambientes laboratoriais, podendo também obter o resultado dentro de alguns minutos, o que não é possível para a técnica de RT-PCR. Entretanto, a eficácia dos testes sorológicos são dependentes da resposta imune do paciente, o qual reflete no período de latência que o vírus leva para estimular a produção de anticorpos, ocorrendo em média entre o 4º e o 7º dia pós infecção para IgM, e 14º dias para IgG. Outro problema é a exposição prévia a outros vírus pertencentes à família coronavírus, levando a resultados falso-positivos (KHAN *et al*., 2020b; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; VABRET *et al*., 2020; WEISSLEDER *et al*., 2020). A figura 9 ilustra este tipo de teste.

Figura 9 - Esquema ilustrando do método de diagnóstico da COVID-19 por meio do teste rápido sorológico.



(a) A amostra de soro do paciente contendo anticorpos contra as proteínas do SARS-CoV-2 é depositada no cassete imunocromatográfico (S = *Sample*) que contém uma membrana de nitrocelulose onde estão imobilizados anticorpos anti-IgG e/ou anti-IgM humanos. **(b)** Em seguida, o tampão salino é gotejado sobre a amostra e deixado **(c)** em repouso para dar início a corrida. A seta amarela simboliza o fluxo operado pela cromatografia. **(d)** Os anticorpos contra o vírus se ligam às proteínas S e N conjugadas a ouro coloidal que também estão no kit, **(e)** os complexos antígeno anticorpo correm pela tira e são detectados pelos anticorpos imobilizados na membrana, resultando no surgimento de uma banda positiva (T = *Testing line*) no cassete. **(f)** O processo é assegurado por um grupo controle (C = *Control line*) formado por um complexo IgG de coelho conjugado a ouro e anti-IgG de coelho na linha controle. **(g)** Cassetes não apresentando bandas ou apenas na altura do resultado positivo são considerados inválidos. **Fonte**: Adaptado de KEVADIYA *et al*. (2021).

A corrida para fornecer meios de detecção do vírus de forma rápida e barata levou à explosão no mercado de diversos testes baseados na identificação de anticorpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2. Entretanto, mesmo sendo assegurado pelos fabricantes sobre não apresentar reação cruzada do método com outros coronavírus humanos ou outros vírus causadores de doenças respiratórias, estudos demonstraram falha na sensibilidade e especificidade de alguns testes disponíveis comercialmente, levando a resultados duvidosos (KRAJEWSKI *et al*., 2020; LI *et al*., 2020; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020). Uma análise realizada sobre a performance do teste rápido VivaDiag^{TM} para o rastreio de pacientes portadores da COVID-19, demonstrou que das amostras positivas, confirmadas pela técnica de RT-PCR, apenas 63.3% indicaram a presença de IgG e IgM após o 7º dia de sintomas, 16.7% foram fracamente positivas para ambas imunoglobulinas, 16.7% delas deram negativas tanto para a presença de IgG quanto para a presença de IgM e apenas 3.3% foi positiva para a presença de IgM mas não para a de IgG, retratando a baixa sensibilidade do método. Em casos agudos, o teste demonstrou apenas 18.4% de sensibilidade e 91.7% de especificidade, não sendo recomendado seu uso na triagem de pacientes suspeitos (CASSANITI *et al*., 2020). Deste modo, técnicas onde haja a captura direta do antígeno se mostra um grande promissor no desenvolvimento de diagnósticos mais sensíveis e precoces na detecção da COVID-19.

Tendo em vista a falta de acurácia apresentada pelos testes imunocromatográficos indiretos, podendo variar a sensibilidade de 45 a 100% e especificidade de 96 a 100%, a busca por testes que sejam mais acurados, de fácil manuseio e baixo custo, torna-se um novo campo a ser explorado no combate da COVID-19 (MOURA *et al*., 2020; ORTIZ-PRADO *et al*., 2020). Devido ao alto valor econômico e a demora entre coleta e liberação de resultados atribuído aos diagnósticos por RT-PCR e a menor acurácia geral dos testes rápidos sorológicos, o desenvolvimento de pesquisas direcionadas ao campo de produção de kits diretos rápidos para a testagem da COVID-19 torna-se de suma importância pois permite tomadas de decisões individuais e políticas no que diz respeito ao distanciamento social e o rastreio de pessoas infectadas (MOURA *et al*., 2020; PEELING *et al*.; 2020). Além disso, os testes rápidos usados no Brasil são ainda importados ou utilizam insumos importados o que atrapalha a independência do país no enfrentamento da COVID-19.

3 JUSTIFICATIVA GERAL

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa, tendo sido confirmado mais de 376.571.514 casos pelo mundo e causado mais de 5.669.704 mortes até a data de 31/01/2022, de acordo com a Universidade Johns Hopkins dos Estados Unidos (*https://coronavirus.jhu.edu/map.html*). No Brasil, mesmo com a subnotificação dos casos, esses números continuam alarmantes. Dados também disponíveis pela Universidade Johns Hopkins demonstram mais de 25.360.647 casos de COVID-19 no país, levando ao óbito de mais de 627.150 brasileiros (31/01/2022).

Além do incentivo à vacinação e às medidas de proteção, uma arma valiosa no combate e controle da COVID-19 é a ampla testagem da população com objetivo de diagnosticar, principalmente, os casos assintomáticos da doença. Nessa vertente, uma testagem rápida, de baixo custo e eficaz se faz necessário para barrar a transmissão da COVID-19.

O uso de testes baseados na captura do antígeno se mostram promissores na detecção do patógeno, podendo ser utilizado antes da janela imunológica do vírus, período em que ocorre a replicação viral. A produção desses agentes de captura de forma racional, combinando ensaios *in silico* com testes *in vitro*, auxiliam no desenvolvimento de testes acurados, em menor tempo e custo de produção. Assim este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um anticorpo em formato scFv de forma racional para aplicação em testes rápidos baseados na captura do antígeno.

CAPÍTULO 1

DESENHO RACIONAL DE ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2 COMO FORMA DE OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS OTIMIZADAS UTILIZANDO DA BIOFÍSICA COMPUTACIONAL

"Ao meu passado eu devo o meu saber e a minha ignorância..."
Ana Caetano, Vitória Falcão e Rita Lee

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano está constantemente sob ataque de organismos invasores, sendo protegido pela atuação do sistema imunológico, o qual compreende uma rede coordenada de sinalização composto por células, barreiras físicas, químicas e biológicas, cuja o objetivo primordial é eliminar e proteger contra o ataque de patógenos (NICHOLSON, 2016). Os anticorpos são imunoglobulinas atuantes nessa defesa e apresentam estruturas em forma de "Y", compostas por uma cadeia proteica leve e outra pesada. A região Fab do anticorpo é constituída por uma porção variável responsável pelo reconhecimento frente ao antígeno, e a porção Fc atua como região efetora do anticorpo (CHIU, *et al*., 2019; SUN *et al*., 2020).

As estruturas scFv, do inglês *single-chain fragment variable*, são anticorpos monoclonais formados por duas cadeias variantes Fv que mantêm a capacidade de reconhecer e se ligar a moléculas estranhas, sendo uma ferramenta biotecnológica utilizada no tratamento de doenças assim como em diagnósticos (AHMAD *et al*., 2012; MONNIER *et al*., 2013). Esses anticorpos podem ser obtidos por meio de diferentes metodologias, tanto biomoleculares ou pelo desenho racional de proteínas, sendo produzidos por técnicas de expressão heteróloga (MA, *et al*., 2017; SARKER *et al*., 2019).

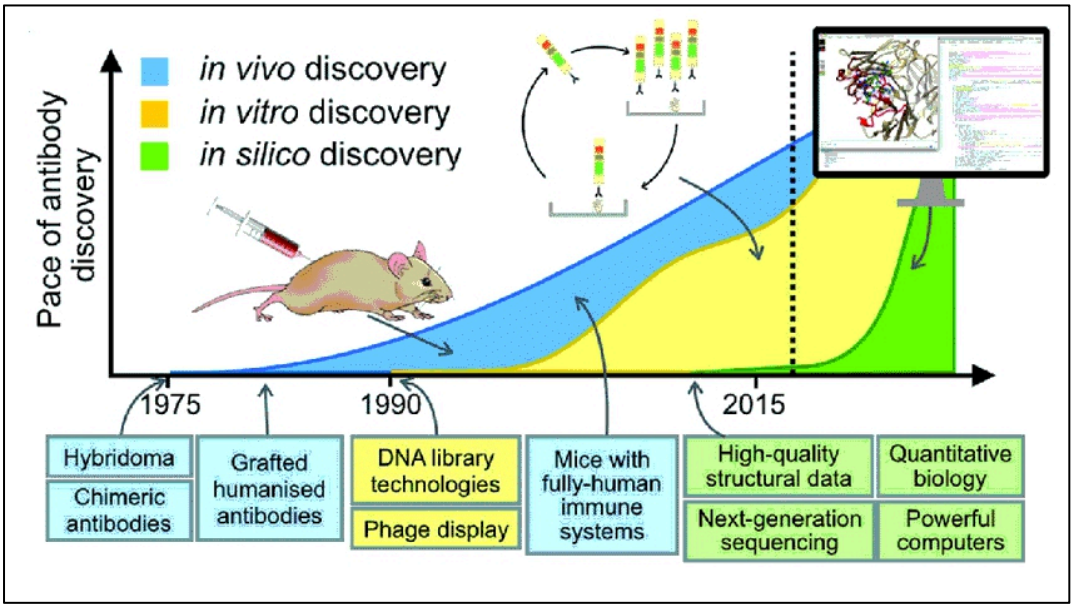
O uso da bioinformática e da biofísica computacional no estudo e desenho de estruturas biológicas teve seu avanço no início do século XXI com o mapeamento e depósito da sequência do genoma humano em bancos de dados biológicos em conjunto com o desenvolvimendo de computadores capazes de efetuarem cálculos e processamento de dados de forma mais rápida (SORMANNI *et al*., 2018). Desse modo, o objetivo desse capítulo foi obter uma estrutura otimizada de anticorpo direcionada a um epítopo antigênico presente no vírus SARS-CoV-2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E ENGENHARIA DE PROTEÍNAS

Anticorpos monoclonais (mAbs do inglês *monoclonal antibodies*) são moléculas monovalentes direcionadas a um único epítopo, sendo amplamente utilizados no tratamento clínico ou empregados em aplicações biotecnológicas. Historicamente, o avanço tecnológico de desenvolvimento dessas proteínas podem ser divididas em três gerações: *in vivo* (por meio da técnica de hibridoma), *in vitro* (tecnologia do DNA recombinante) e *in silico* (abordagens computacionais aplicada ao desenho racional de anticorpos) (Figura 10) (LIU, 2014; SORMANNI *et al*., 2018).

Figura 10 - Histórico de desenvolvimento dos anticorpos monoclonais.

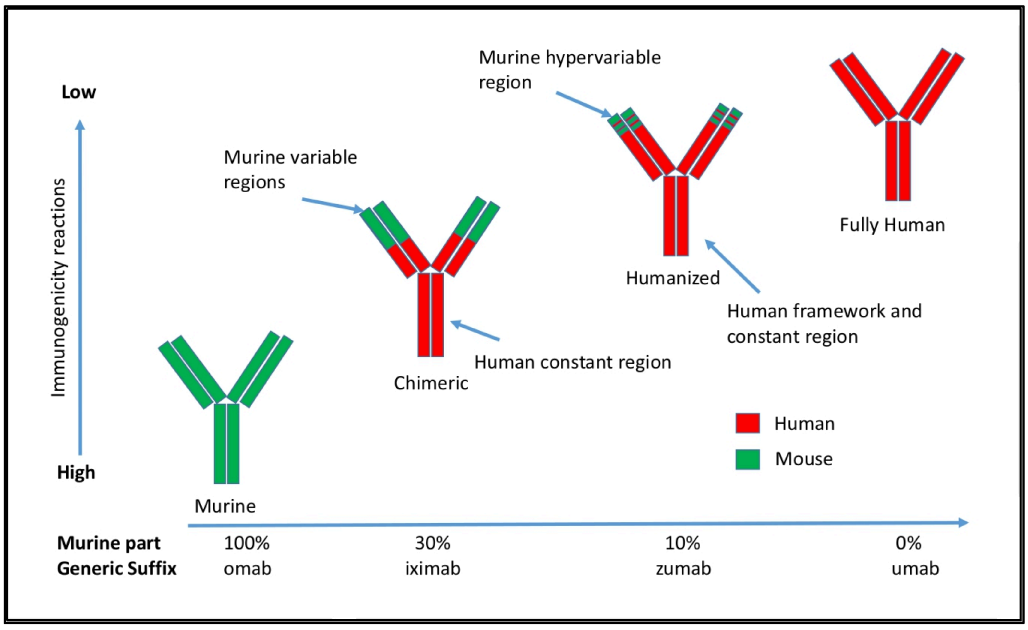


A primeira geração é marcada pelos testes *in vivo*, como a técnica de hibridoma e a produção de mAbs quiméricos e humanizados. A segunda geração é caracterizada pelo avanço da biologia molecular e os ensaios *in vitro*, como a tecnologia de *Phage display* e as bibliotecas de DNA. A terceira geração usufrui das tecnologias computacionais e o dos métodos de bioinformática, consagrando a nova fase de estudos *in silico* na produção de mAbs. **Fonte**: Adaptado de SORMANNI *et al*. (2018).

A primeira geração de mAbs procedeu-se pelo desenvolvimento da técnica de hibridoma pelos pesquisadores Köhler e Milstein (1975), a qual consiste na imunização de camundongos com o antígeno alvo para obtenção de células B murinas, seguido da fusão

dessas com células de mielomas imortalizadas e com alta taxa de multiplicação, levando a produção de anticorpos com especificidade pré-definida (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Entretanto, foi observado que os pacientes tratados com os mAbs murinos desenvolveram anticorpos humanos anti-camundongo, gerando hipersensibilidade e ineficácia da terapia, acarretando na dificuldade de sua aplicação na clínica (Figura 11) (SGRO, 1995; HWANG *et al.*, 2005; NEWSOME *et al*., 2008).

Figura 11 - Processo de humanização de anticorpos monoclonais com o objetivo de diminuir as reações antigênicas causadas pela molécula.



Os sufixos omab, iximab, zumab, umab, correspondem respectivamente a forma de obtenção do anticorpo, sendo ele murino, quimérico, humanizado e humano. **Fonte**: SINGH *et al*. (2018).

Novas metodologias com o objetivo de amenizar os efeitos adversos ocasionados pelo uso dos anticorpos monoclonais murinos foram sendo desenvolvidos, caracterizando uma transição entre os mAbs de primeira geração para aqueles ditos de segunda geração, usando da combinação de ensaios *in vitro* com os testes *in vivo* para a produção de anticorpos monoclonais quiméricos, onde a porção Fab é proveniente de camundongos, enquanto o domínio Fc parte de uma imunoglobulina humana, e os anticorpos monoclonais humanizados, produzidos por meio de tecnologia do DNA recombinante, apresentam as CDRs murinas transferidas para a região Fv da porção Fab de um anticorpo humano, tornando-o menos propenso a desenvolver anticorpos humanos anti-camundongo, diminuindo, desse modo, as

reações adversas, a qual reflete na tolerância dessa molécula (MORRISON *et al*., 1984; LOBUGLIO *et al*., 1989; ESTRUCH, 2013).

Com a evolução das ciências biomédicas, sendo alavancada principalmente pelo Projeto Genoma Humano no final do século XX, tecnologias de sequenciamento de próxima geração em conjunto com métodos espectroscópicos mais robustos e o desenvolvimento de computadores capazes de efetuarem cálculos e processamento de dados de forma mais rápida, milhares de sequências e estruturas de complexos antígeno-anticorpo inundaram os bancos de dados biológicos, fornecendo informações altamente precisas acerca de suas propriedades biofísicas, impulsionando o avanço da terceira geração de produção de anticorpos, caracterizado pelo desenho racional dessas proteínas por meio da aplicação de métodos *in silico* (SORMANNI *et al*., 2018).

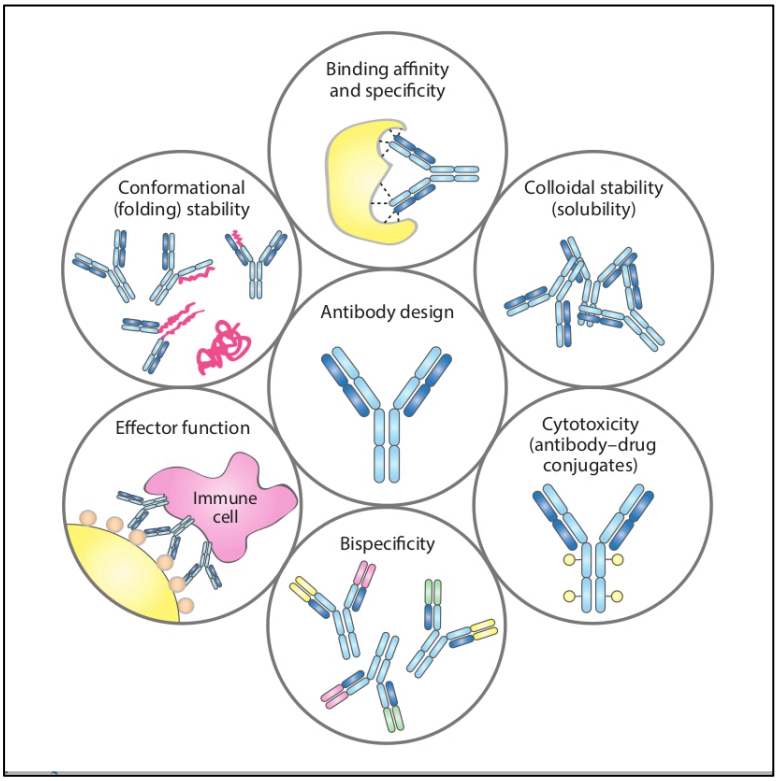
2.1.1 Desenho racional de anticorpos por meio de abordagens computacionais

A imunologia sintética é um campo de estudo em ascensão situada entre a imunologia e a biologia sintética, a qual aborda métodos *in silico* para a construção de proteínas engenheiradas de interesse clínico e biotecnológico, como o desenvolvimento de anticorpos de terceira geração, tendo o mercado farmacêutico global estimado em US$ 140 bilhões até o ano de 2024 e se consagrando como uma abordagem crítica para acelerar e auxiliar no processo de produção de novos anticorpos obtidos de forma racional (MUSTAFA, 2020). Apesar do crescimento exponencial acerca dessa nova temática de estudo, ainda não há um protocolo geral estabelecido para o desenho dessas proteínas, fazendo com que haja uma variedade de metodologias adotadas na literatura (GEERING *et al*., 2015; MUSTAFA, 2020).

O desenho racional de anticorpo trata-se do uso de um conjunto de técnicas computacionais cuja o objetivo é o aperfeiçoamento das propriedades físico-químicas da estrutura protéica, a qual pode envolver a otimização da afinidade de ligação e especificidade do anticorpo pelo antígeno, utilizando de modificações nas regiões CDRs localizadas no paratopo da molécula, aumento da solubilidade e estabilidade conformacional da proteína para ganho de tempo de prateleira por meio da otimização dos resíduos expostos e escondidos do solvente, respectivamente, e a biespecificação de anticorpos para dois antígenos diferentes ou dois epítopos de um mesmo antígeno, além de possibilitar a construção de anticorpos engenheirados, permitindo a conjugação desses à fármacos e modificações em suas funções

efetoras por meio de alterações nas regiões de “dobradiça” e na porção Fc da estrutura do anticorpo (Figura 12) (TILLER *et al*., 2015; KURODA *et al*., 2020; MUSTAFA, 2020).

Figura 12 - Principais propriedades envolvidas no desenho racional de anticorpos.



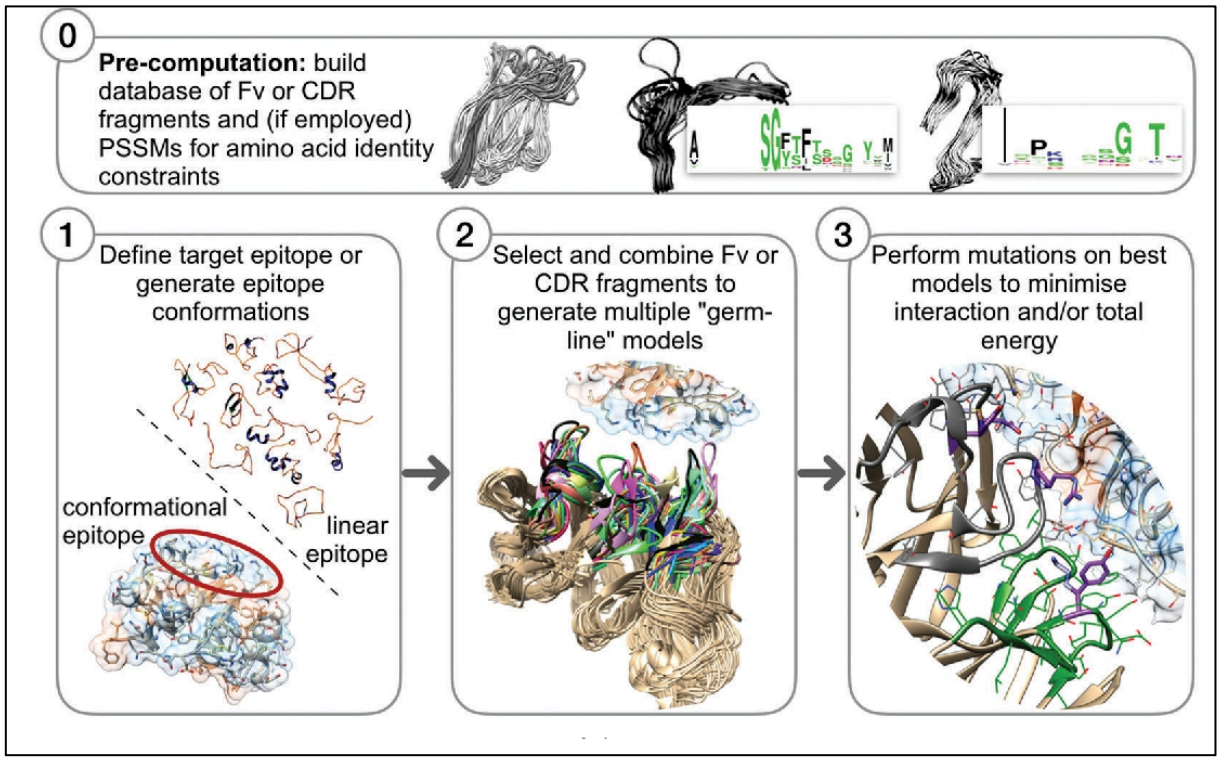
As principais abordagens envolvidas no desenho racional de anticorpos estão relacionados com alterações na especificidade e afinidade de ligação da molécula, solubilidade e estabilidade conformacional da estrutura, biespecificidade e conjugação à fármacos. **Fonte**: TILLER *et al*. (2015).

Alguns métodos clássicos utilizados na biofísica computacional, como a modelagem comparativa e a ancoragem molecular, auxiliam no delineamento de uma nova estrutura de anticorpo. Além disso, a compreensão, em sua totalidade, das interações formadas entre o complexo epítopo-paratopo em nível atômico desempenha papel crucial para o desenho racional de uma nova molécula terapêutica, podendo ser alcançada rapidamente por meio de ferramentas computacionais (NORMAN *et al*., 2019).

Apesar do avanço tecnológico observado nas últimas décadas e o enriquecimento dos bancos de dados de estruturas de proteínas obtidas por métodos experimentais, o desenvolvimento de anticorpos *de novo* ainda é considerado um obstáculo para os pesquisadores, devido a dificuldade apresentada em acessar a dinâmica do reconhecimento

molecular coordenada pelas regiões CDRs compostas por *loops* altamente flexíveis (MAKABE, 2020). Porém, atualmente quatro metodologias utilizando deste princípio foram disponíveis e avaliadas experimentalmente: *Optimal Complementarity Determining Regions* (OptCDR) (PANTAZES *et al*., 2010), *Optimal Method for Antibody Variable region Engineering* (OptMAVEn) (LI *et al*., 2014), *Antibody Design* (AbDesign) (LAPIDOTH *et al*., 2015) e *RosettaAntibodyDesign* (RAbD) (ADOLF-BRYFOGLE *et al*., 2018). A figura 13 representa as principais etapas envolvidas na construção de um modelo de anticorpo pela metodologia *de novo* empregada pelos algoritmos citados.

Figura 13 - Principais etapas envolvidas no desenho racional de anticorpos por metodologia *de novo*.



De forma sucinta, o protocolo utilizado pelos métodos visam a construção de um novo paratopo para o anticorpo por meio da geração de um banco de dados contendo sequências ou estruturas de regiões Fv e CDRs (Etapa 0), seguido da identificação dos epítopos do antígeno - linear ou conformacional - (Etapa 1) e a inserção dessas regiões de reconhecimento molecular a uma nova sequência proteica (Etapa 2). Após a construção dos modelos, cálculos de ancoragem molecular são realizados para a formação do complexo antígeno-anticorpo, prosseguindo para a etapa de refinamento das estruturas, onde mutações pontuais são previstas para otimizar a energia de interação entre as moléculas (Etapa 3). **Fonte**: SORMANNI *et al*. (2018); NORMAN *et al*. (2019).

Recentemente, o método Modular foi utilizado para projetar anticorpos direcionados a epítopos intrinsecamente desenovelados (SORMANNI *et al*., 2015). Essa abordagem utiliza-

se da separação, em diferentes módulos, das etapas relacionadas ao desenho da molécula de acordo com as propriedades biofísicas requeridas pela proteína. Nesse sentido, para prever a solubilidade do anticorpo com o objetivo de minimizar sua capacidade de se auto agregar, e também classificar regiões de ligação ao antígeno de acordo com sua solubilidade, o Modular emprega uma segunda metodologia denominado CamSol (SORMANNI *et al*., 2018; KURODA *et al*., 2020). Por outro lado, a otimização das regiões CDRs para ganho de interações entre o complexo antígeno-anticorpo pode ser alcançada empregando o método de Cascata, o qual permite o desenho de peptídeos complementares com afinidade para o epítopo linear de interesse, seguido da inserção desses em um arcabouço de anticorpo (SORMANNI *et al*., 2015; SORMANNI *et al*., 2018; APRILE *et al*., 2020).

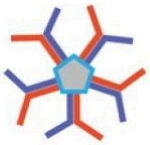
Tecnologias alternativas com o intuito de otimizar e fornecer diferentes abordagens no desenvolvimento de proteínas engenheiradas crescem a cada dia, contribuindo para a ampliação da biologia computacional e produção de novas moléculas biologicamente funcionais. Métodos baseados em conhecimentos físico-químicos, como simulações de dinâmica molecular e varredura mutacional, oferecem auxílio tanto no desenho de um anticorpo pelas técnicas *de novo* quanto na projeção de um novo anticorpo de forma sistemática (TILLER *et al*., 2015).

2.2 ESTRUTURA DE ANTICORPO E MECANISMO DE RECONHECIMENTO MOLECULAR

O sistema imunológico pode ser descrito como uma complexa rede de sinalização a qual, por intermédio de células e moléculas, protege o corpo humano contra a invasão de patógenos, sendo capaz de reconhecer estruturas não próprias, os antígenos, com finalidade de desenvolver uma resposta efetiva para detê-los. Didaticamente, o sistema imune divide-se em sistema imune inato e sistema imune adaptativo, sendo esse subdividido em imunidade humoral e imunidade celular (NICHOLSON, 2016; ABBAS, 2019). Os anticorpos, também chamados de imunoglobulinas, fazem parte da imunidade humoral, sendo proteínas produzidas pelos linfócitos B. Eles podem ser monômeros, dímeros, ou pentâmeros. Essas imunoglobulinas compreendem cinco diferentes classes (IgG, IgA, IgM, IgE e IgD), desempenhando papéis importantes na proteção contra patógenos, sinalização celular, opsonização de partículas e processos alérgicos, por exemplo (Figura 14). A classe IgA

apresenta dois isotipos, IgA1 e IgA2, e a classe IgG subdivide-se em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (SCHROEDER *et al*., 2010; NICHOLSON, 2016)

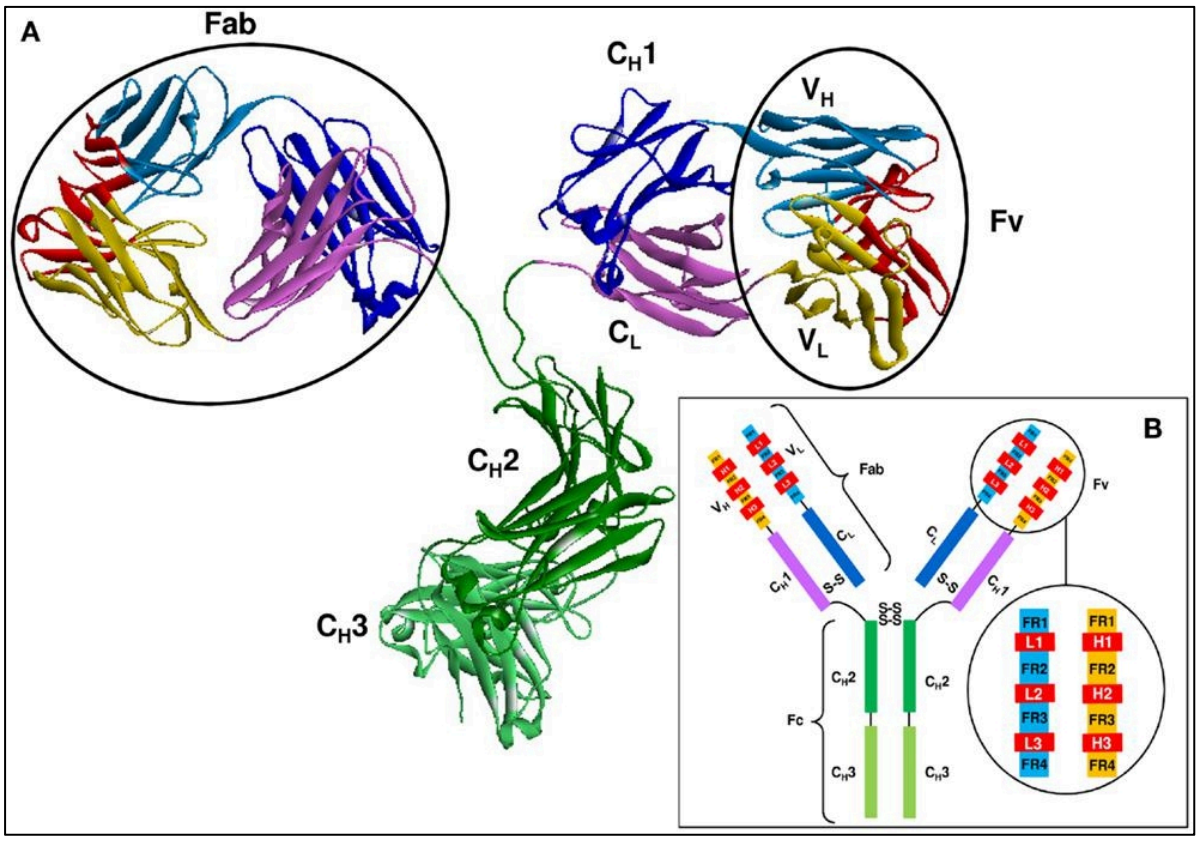
Figura 14 - Principais classes de anticorpos encontrados em soro humano e algumas funções desempenhadas durante a proteção do organismo coordenadas pelo sistema imunológico.

Main antibody isotype	Secreted form		Functions
IgD	None		Naive B-cell receptor
IgM	Pentamer		Naive B-cell receptor, natural antibodies, complement activation
IgG	Monomer		**Opsonization**, complement activation, neonatal immunity
IgE	Mostly bound to cells		Defence against parasites, Allergy
IgA	Dimer, secreted into mucus		Mucosal immunity

As cinco classes de anticorpos humanos podem ser encontrados como monômeros, dímeros ou pentâmeros, podendo estar aderido as células ou secretadas no meio, executando funções como receptor celular, opsonização de antígenos, defesa contra ataque de patógenos, entre outros. **Fonte:** NICHOLSON (2016).

Estruturalmente, os anticorpos apresentam formato de "Y", sendo constituído por duas cadeias pesadas (C_H do inglês *heavy chain*) e duas cadeias leves (C_L do inglês *light chain*), dando origem a porção Fab (do inglês *antigen-binding fragment*) da estrutura. Esta subdivide-se em região variável (Fv do inglês *fragment variable*), a qual contém as regiões determinantes de complementaridade (CDRs do inglês *complementarity-determining regions*) e região constante, interligada entre si por uma ponte dissulfeto. A porção Fab se liga a porção Fc (do inglês *fragment crystallizable)* por meio de um *hinge*, estrutura semelhante a uma "dobradiça", o que possibilita flexibilidade de conformações. Essa região é composta por um domínio contendo quatro cadeias pesadas (C_{H2}, C_{H2}, C_{H3} e C_{H3}) interligadas por um resíduo de cisteína conservada entre as duas cadeias C_{H2} (Figura 15). Além de diferir da porção Fab por conter sítios de glicosilação, a porção Fc atua como região efetora do anticorpo, podendo interagir com uma variedade de receptores moleculares (CHIU, *et al*., 2019; SUN *et al*., 2020).

Figura 15 - Estrutura tridimensional um anticorpo PDB ID 1IGT.

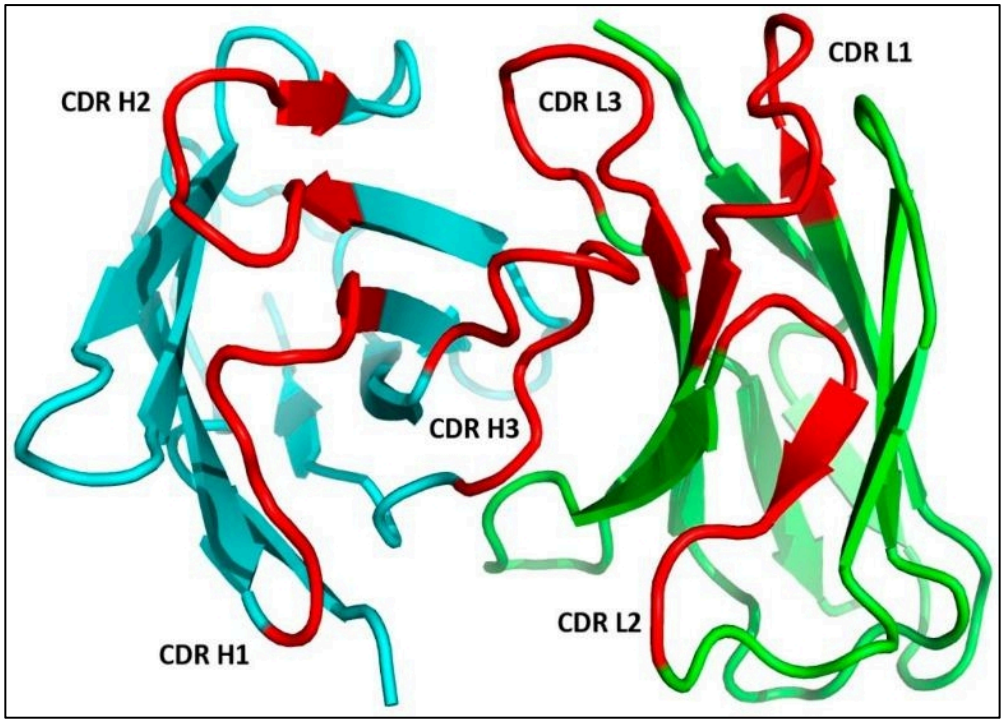


(A) Divisão estrutural destacando a porção Fab e a porção Fv, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. **(B)** Esquema em 1D das subdivisões do anticorpo localizando as cadeias pesadas e as cadeias leves, além de detalhar as regiões CDRs. Fab: *Fragment antigen-binding;* Fv: *Fragment variable*; V_H e V_L: *Heavy and Light chain of variable domain*; C_H e C_L: *Heavy and Light chain of constant domain*.**Fonte**: SELA-CULANG *et al*., (2013).

O pareamento dos domínios V_H e V_L situados na porção Fv do anticorpo contribuem para a formação das regiões CDRs localizado no paratopo da molécula, local responsável por promover o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. Essas regiões são constituídas por estruturas em forma de *loops* hipervariáveis, sendo três localizados na cadeia leve (L1, L2, e L3) e outros três situados na cadeia pesada (H1, H2 e H3), suportados por um motivo conservado em conformação β (Figura 16) (SELA-CULANG *et al*., 2013; CHIU, *et al*., 2019).

Modificações na composição dos resíduos de aminoácidos presentes nas CDRs com o objetivo de otimizar sua afinidade frente ao antígeno são ferramentas alternativas para produção de anticorpos monoclonais de interesse industrial e de forma racionalizada (SORMANNI *et al*., 2018).

Figura 16 - Vista superior do paratopo de um anticorpo



Em destacando as regiões CDRs (vermelho) presentes na cadeia pesada (ciano) e na cadeia leve (verde) da estrutura de um anticorpo (PDB ID 5I1A). **Fonte**: CHIU *et al*. (2019).

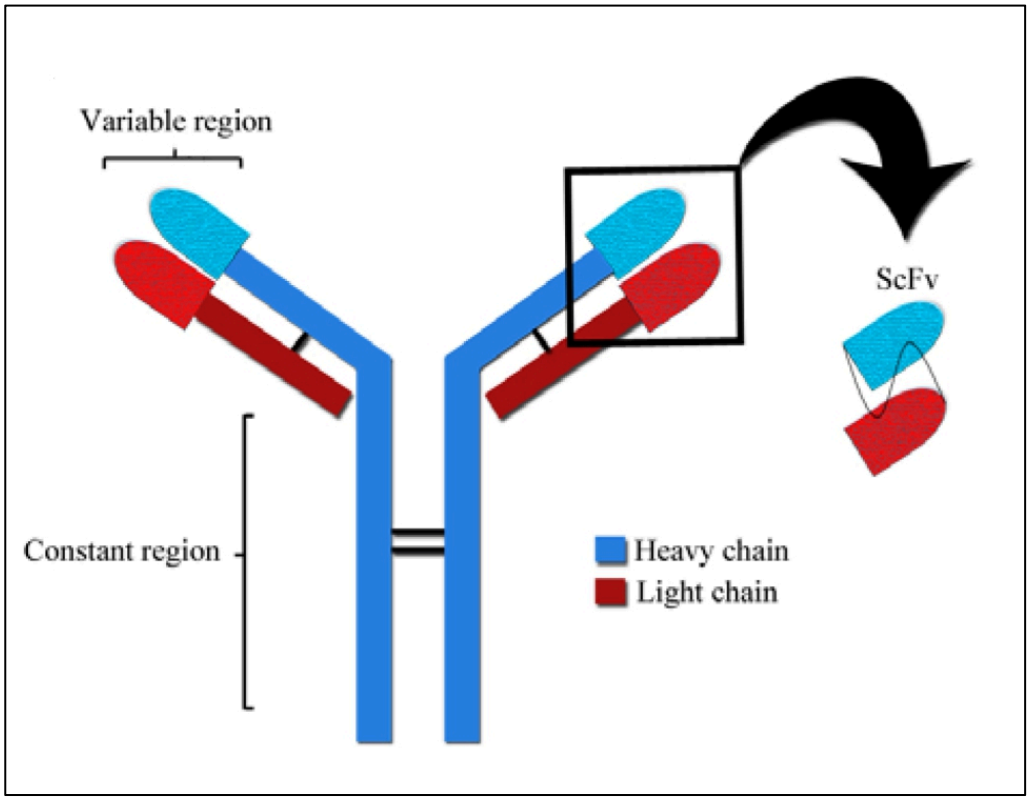
2.2.1 Anticorpos scFv: Vantagens e limitações

Os fragmentos variáveis de cadeia única, do inglês *single-chain fragment variable* (scFv), são anticorpos monoclonais engenheirados de baixa massa molecular e com capacidades reduzidas de desencadear reações imunogênicas, favorecendo sua aplicação no diagnóstico e prevenção de doenças. Além disso, essas moléculas são passíveis de serem expressas de forma eficiente em microorganismos, especialmente em *Escherichia coli*, acarretando no barateamento do custo de produção e possibilidade de escalonamento industrial (MONNIER *et al*., 2013; MA, *et al*., 2017; SARKER *et al*., 2019; KHAN, 2020a).

Estruturalmente, um anticorpo scFv apresenta cerca de 30 kDa, sendo constituído por uma região variável da cadeia leve (V_L) e uma região variável da cadeia pesada (V_H). Os domínios proteicos são interligados por meio de uma alça flexível composta por 15 a 20 resíduos de aminoácidos, formada geralmente por quatro resíduos de glicina e um resíduo de serina (G_4-S), ou ainda intercalada com resíduos de aminoácidos carregados (glutamato e lisina) para o aumento da solubilidade da molécula (Figura 17). O comprimento da alça, assim

como sua composição peptídica, é essencial para garantir o correto dobramento da estrutura. Além disso, foi visto que a orientação V_H-alça-V_H demonstra maior capacidade de ligação ao antígeno quando utilizado em ensaios de ELISA direto em comparação a orientação V_H-alça-V_L, entretanto, a maioria das construções de anticorpos scFv são obtidas na orientação V_H-alça-V_L (AHMAD *et al*., 2012; CRIVIANU-GAITA *et al*., 2016; HULSEWEH, 2018).

Figura 17 - Estrutura de Anticorpo scFv.



Anticorpos scFv são fragmentos de uma molécula de anticorpo cujas regiões variáveis responsáveis pela ligação ao antígeno estão conservadas e unidas por um peptídeo flexível. **Fonte**: Adaptado de MONNIER *et al*. (2013).

As características estruturais adotadas pelos anticorpos scFv refletem diretamente em alterações de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. O tamanho compacto do fragmento de anticorpo permite que este atinja regiões não acessíveis para estruturas completas de anticorpo, levando a maior distribuição em tecidos. Além disso, anticorpos scFv apresentam altas taxas de depuração sanguínea, sendo por exemplo, utilizados no tratamento de tumores por meio da conjugação da estrutura a radionuclídeos, onde a rápida eliminação das moléculas diminuem a exposição destas à tecidos sadios, tornando o procedimento menos propenso a induzir citotoxicidade (MONNIER *et al*., 2013). Esta característica se deve a falta

do domínio Fc responsável por contribuir na estabilidade da estrutura de um anticorpo completo, resultando na diminuição do seu tempo de meia-vida quando administrados em humanos, sendo esta consequência do metabolismo sofrido pelas moléculas por meio da ação de complexos enzimáticos, podendo limitar sua utilização como biofármaco. Por outro lado, a carência da porção Fc acarreta na baixa imunogenicidade apresentada pelos fragmentos de anticorpos, tornando-os ótimos agentes terapêuticos quando comparado a uma molécula completa (NELSON, 2010; MONNIER *et al*., 2013; FARAJNIA *et al*., 2014; AGUIAR *et al*., 2021). A tabela 1 lista algumas moléculas em fase de estudo clínico ou aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

Tabela 1 - Anticorpos scFv em fase de estudo ou aprovados pelo FDA como biomolécula aplicada no tratamento de diferentes doenças.

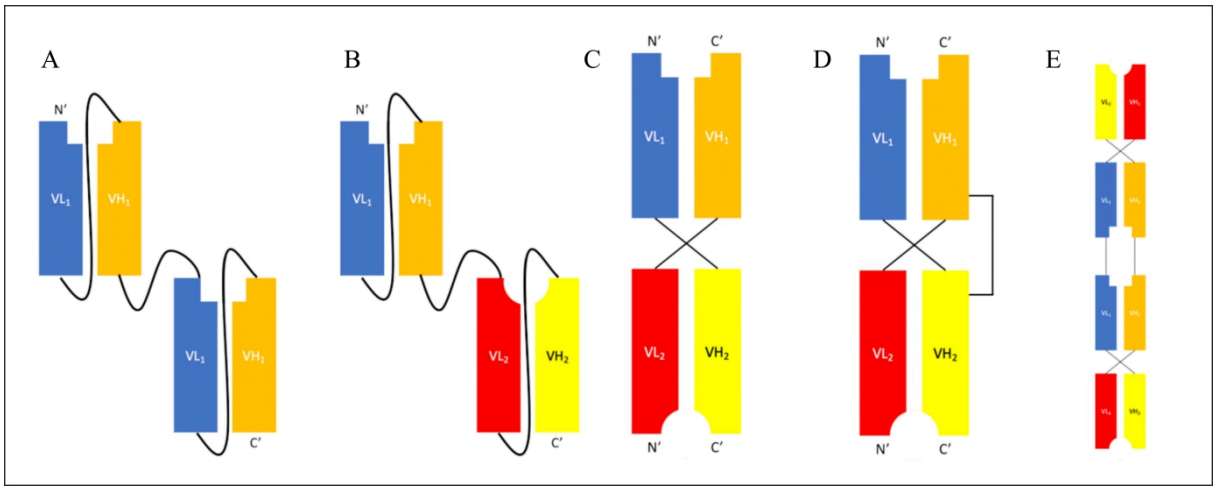
Nome de Registro	Alvo Molecular	Indicação	Fase de Estudo[#]	Número de Registro[#]	Referência
Pexelizumab	C5	Infarto do miocárdio e inflamações pós cirúrgicas	Fase 3 (Completo)	NCT00048308, NCT00091637, NCT00088179	PATEL *et al*., 2008
Efungumab	HSP90	Antimicótico	Fase 2 (Completo)	NCT00324025	KARWA *et al*., 2009
Oportuzumab monatox (VB4-845)	EpCAM	Carcinoma urotelial	Fase 3	NCT02449239	KOWALSKI *et al*., 2012
Gancotamab (MM-302)	HER2	Câncer de mama	Fase 1	NCT01304797	MUNSTER *et al*., 2018
MT-3724	CD20	Linfoma difuso de grandes células B	Fase 2	NCT03645395, NCT02361346, NCT02715843	HUANG *et al*., 2018
Daromun (L19IL2 + L19TNF)	Extra-domínio B da fibronectina	Melanoma	Fase 3	NCT03567889, NCT02938299	MIURA *et al*., 2019
Brolucizumab (RTH258, ESBA1008)	VEGF	Degeneração macular relacionada à idade	Fase 4	NCT04774926, NCT04597632, NCT04287348	NGUYEN *et al*., 2020
Flotetuzumab (MGD006)	CD3ε e CD123	Leucemia mieloide aguda refratária	Fase 1	NCT04681105, NCT04678466, NCT04158739	UY *et al*., 2021

[#]Informações consultadas no diretório < https://clinicaltrials.gov/> **Fonte**: Este trabalho.

A partir de uma estrutura em formato scFv, anticorpos engenheirados têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar ou aperfeiçoar características relacionadas ao

reconhecimento do antígeno pela anticorpo, como os anticorpos scFv em tandem e diacorpos, os quais são dímeros de scFv bi- tri- e tetravalentes, sendo estruturas capazes de apresentar biespecificidade frente ao antígeno (NELSON, 2010; BATES *et al*., 2019) (Figura 18).

Figura 18 - Anticorpos engenheirados a partir de uma estrutura scFv.



(A) Anticorpo scFv em tandem bivalente monoespecífico. **(B)** Anticorpo scFv em tandem bivalente biespecífico. **(C)** Anticorpo scFv diacorpo bivalente biespecífico. **(D)** Anticorpo scFv diacorpo bivalente biespecífico contendo uma ligação dissulfeto entre os domínios. **(E)** Anticorpo scFv diacorpo tetravalente biespecífico. **Fonte**: Adaptado de BATES *et al*. (2019).

Os anticorpos scFv apresentam processo de produção industrial facilitado e de baixo custo, características relacionadas ao tamanho da molécula e a não necessidade de modificações pós-traducionais, os quais permitem que esse seja produzido em diversos sistemas de expressão, como plantas (FIEDLER *et al*., 1997; SATHEESHKUMAR, 2020), leveduras (ZAREI *et al*., 2014; WANG *et al*., 2018), bactérias (SARKER *et al*., 2019; KANG *et al*., 2020b), insetos (REAVY *et al*., 2000; SAKAMOTO *et al*., 2010) e células de mamíferos (CHENG *et al*., 2003; HO *et al*., 2009; VENDEL *et al*., 2012; LONGATTI *et al*., 2018).

O método de expressão heteróloga em *E. coli* é o mais utilizado para produzir anticorpos scFv funcionais, tendo em vista que esses não necessitam de glicosilações, como observado para imunoglobulinas completas (AHMAD *et al*., 2012; AGUIAR *et al*., 2021). Estruturalmente, essas proteínas apresentam duas ligações dissulfetos, localizadas uma em cada domínio do anticorpo, sendo corretamente formadas em compartimentos oxidantes da célula bacteriana. Na região do citoplasma, caracterizado por um ambiente redutor, a

expressão dessas proteínas leva a formação de corpos de inclusão insolúveis, os quais necessitam de renaturação pós processamentos (SARKER *et al*., 2019). Para contornar esse problema, a inserção de um peptídeo sinal na porção N-terminal do anticorpo scFv é utilizado para direcionar a produção para o espaço periplasmático da célula, onde o ambiente oxidativo é propenso para a otimização do correto enovelamento do anticorpo produzindo estruturas solúveis. Outra abordagem é a utilização de cepas de *E. coli* engenheiradas, as quais permitem a obtenção dessas proteínas solúveis no próprio citoplasma da célula (BLAžEK *et al*., 2003; KANG *et al*., 2020b).

2.3 MÉTODOS DE BIOFÍSICA COMPUTACIONAL APLICADO AO ESTUDO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS

Com o mapeamento e depósito da sequência do genoma humano no início do século XXI, a biologia computacional vem se expandindo como ferramenta promissora no estudo de moléculas e redes de interações moleculares que regem o corpo humano. Essa nova biologia compreende duas grandes áreas, as quais podem ser classificada de acordo com seu objetivo de estudo: a primeira, relacionada a sequências biológicas, análises de banco de dados, ao estudo das ciências ômicas e a biologia de sistemas; enquanto a segunda trata-se da biofísica computacional, utilizando de conceitos físicos, químicos e termodinâmicos para compreender a estrutura e função de biomoléculas (HOOD *et al*., 2013; DINIZ *et al*., 2017).

2.3.1 Métodos de construção de modelos tridimensionais

O crescimento acelerado do depósito em bancos de dados biológicos de estrutura de proteínas elucidadas por métodos experimentais, como a ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia por difração de raio-X, em paralelo com o aumento do poder computacional e do sequenciamento de genomas, permitiram avanços no conhecimento tridimensional acerca da arquitetura dessas moléculas. Entretanto, as limitações relacionadas aos métodos como o tamanho da proteína requerido para ser elucidada por RMN e a dificuldade da obtenção de um cristal por cristalografia, levou a necessidade do aperfeiçoamento de algoritmos capazes de predizer a estrutura dessas moléculas, fazendo com que a construção de modelos *in silico* tseja uma importante ferramenta no desenho racional e produção de fármacos, entre outros insumos de interesses biotecnológicos (FORSTER, 2002; MAVROMOUSTAKOS, *et al*. 2011; KUHLMAN, *et al*., 2019).

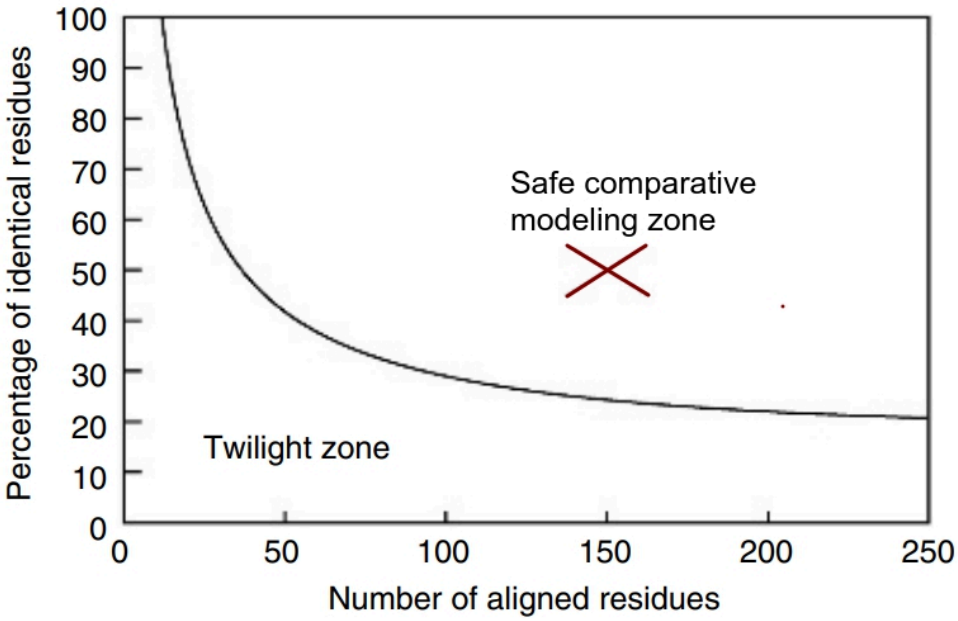
Didaticamente, as estratégias para gerar modelos de proteínas por métodos computacionais podem ser classificadas em dois principais grupos: métodos dependentes de moldes e métodos independentes de molde (KUHLMAN, *et al*., 2019). A abordagem empregada varia de acordo com a disponibilidade de informações acerca da estrutura requerida, sendo estas obtidas em bancos de dados biológicos (WEBB *et al*., 2014).

Os métodos dependentes de uma estrutura molde utilizam-se do conhecimento prévio relacionado a identidade existente entre a sequência alvo a ser modelada e a estrutura de alguma proteína elucidada por meios experimentais. Esse método inclui a modelagem comparativa (KRIEGER *et al*., 2003) e o *threading*, também conhecido como método de reconhecimento de padrão de enovelamento (ZHANG, 2007). Por outro lado, situações onde a sequência alvo não apresenta similaridade com estruturas descritas, se faz necessário o emprego de ferramenta a qual não necessita de proteínas moldes como referência, baseado estritamente na hipótese de dobramento termodinâmico proposta pelo químico Anfinsen, onde a estrutura nativa corresponde ao mínimo global de sua energia livre sob determinado conjunto de condições. Esses métodos são conhecidos como *ab initio* (PAVLOPOULO *et al*., 2011). No entanto, atualmente essas divisões não se encontram estritamente isoladas, de modo que alguns servidores de predição de estrutura terciária incorporam em sua metodologia cálculos de energia para refinar o modelo gerado (KUHLMAN, *et al*., 2019).

2.3.1.1 *Modelagem comparativa*

Como retratado anteriormente, a escolha do tipo de método a ser empregado está relacionado com a porcentagem de identidade existente entre os resíduos de aminoácidos presentes na sequẽncia-alvo e aqueles contidos na estrutura de proteínas previamente elucidadas. Alguns autores retratam que a porcentagem mínima deve se situar entre 30 a 25%, onde valores menores torna-se preferível a adoção de outros métodos (KRIEGER *et al*., 2003; PAVLOPOULO *et al*., 2011). A figura 19 ilustra um gráfico o qual auxilia nas tomadas de decisão.

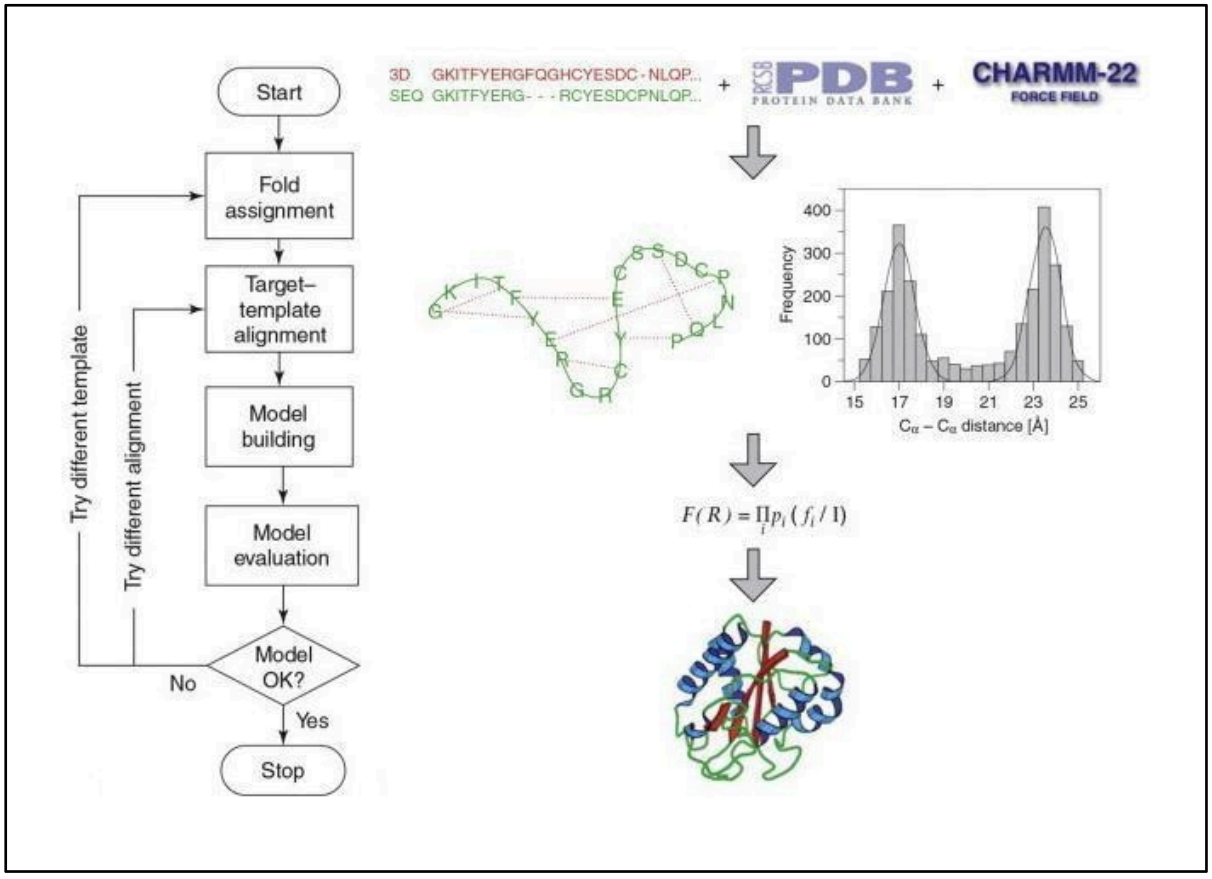
Figura 19 - Gráfico esquemático representando a porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos em relação ao tamanho da sequência comparada.



A área denominada "*Safe comparative modeling zone*", ou seja, região segura para a modelagem comparativa, representada pela marcação em vermelho, simboliza a porcentagem mínima ideal para a predição da estrutura de proteínas por este método. Enquanto a área "*twilight zone*", representa a região de transição onde o pesquisador deve avaliar cuidadosamente se deve ou não adotar esse método ou empregar outros. **Fonte**: Adaptado de KRIEGER *et a*l. (2003).

O fluxo do processo envolvidos durante a modelagem comparativa consiste em cinco principais etapas: 1º) A identificação de estruturas moldes depositadas em bancos de dados e a escolha do melhor baseando no valor de identidade entre os resíduos de aminoácidos; 2º) O alinhamento entre a sequência alvo e a estrutura molde; 3º) A construção do modelo tridimensional, a qual é dependente da abordagem utilizada pelo algoritmo de modelagem comparativa (montagem baseada em fragmento ou corpos rígidos, método de correspondência de segmento e satisfação de restrições espaciais); 4º) Otimização do modelo gerado; 5º) Validação do modelo final, onde é analisada sua qualidade energética, estereoquímica e a correlação existente entre a estrutura 3D e a sequência primária (Figura 20) (FORSTER, 2002; KRIEGER *et a*l., 2003; PITMAN *et al*., 2006; DINIZ *et al*., 2017).

Figura 20 - Fluxograma ilustrando o método de modelagem comparativa adotando algoritmos de satisfação de restrições espaciais.



Inicialmente, ocorre a pesquisa por proteínas homólogas, seguido do alinhamento entre a sequência primária e a estrutura 3D. Logo após, o modelo é construído por meio da coleta de dados derivados da estrutura de referência utilizando funções estatísticas e um campo de força (CHARMM-22), para ajustar a estereoquímica da molécula. O modelo então é avaliado quanto sua qualidade, podendo seguir para novos experimentos ou ser adotado novas formas de otimização. **Fonte**: Adaptado de WEBB *et a*l. (2014).

O uso da modelagem, em conjunto com técnicas baseadas em funções de energia, como os cálculos de mutações sítio-dirigidas, vem sendo utilizados com sucesso para predizer mudanças na estabilidade conformal de proteínas, como por exemplo na estrutura de anticorpos, onde essas mutações pontuais são realizadas com o objetivo de analisar as contribuições apresentadas por cada resíduo de aminoácido em promover ligação frente ao antígeno, podendo auxiliar no desenho de novas moléculas com aprimoramento na afinidade de reconhecimento molecular (KURODA *et al*., 2020; LUAN *et al*., 2020; WARSZAWSKI *et al*., 2020). A expansão desse método, como as mutações de ponto duplo onde dois resíduos são mutados simultaneamente, também estão sendo amplamente investigados e aplicados no estudo *in silico* de anticorpos racionalmente projetados (CHIBA *et al*., 2020).

2.3.2 Simulações de dinâmica molecular

Enquanto a modelagem molecular fornece estruturas biomoleculares estáticas, a realidade molecular ocorre de forma dinâmica, ou seja, ao longo do tempo. A flexibilidade estrutural de proteínas garante o seu desempenho *in vivo*, sendo responsável por processos celulares como a transdução de sinal, catálise enzimática e reconhecimento molecular, e podem ser acessadas computacionalmente por métodos mais complexos (LAZIM *et al*., 2020).

A mecânima molecular (MM) pode ser descrita como um conjunto de funções matemáticas simplificadas de energia potencial, os quais são utilizadas na modelagem de sistemas moleculares (ADCOCK *et al*., 2006). Essas simplificações e aproximações, como o emprego de potencial harmônico para descrever termos de estiramento de ligação, flexão de ângulo, diedros próprios e impróprios (Equação 1.0), ou ainda o uso do potencial de Lennard-Jones e equações de Coulomb para se tratar de átomos não ligados (Equação 1.1), permitem o uso da mecânica molecular em diferentes sistemas, abrangendo desde moléculas de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos, até estruturas mais complexas, como proteínas e ácidos nucleicos (GONZÁLEZ, 2011; VANOMMESLAEGHE *et al*., 2015; POLTEV, 2016).

Equação referente a energia potencial para átomos ligados: (1.0)

$$U_{ligado} = \sum_{ligação} K_b\,(b - b_0)^2 + \sum_{ângulo} K_\theta\,(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\substack{diedro \\ impróprio}} K_\varphi\,(\varphi - \varphi_0)^2 + \sum_{\substack{diedro \\ próprio}} K_\phi\,(1 + \cos(n\phi - \delta_0))$$

Equação referente a energia potencial para átomos não ligados: (1.1)

$$U_{nao\ ligado} = \sum_{Lennard-Jones} 4\varepsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] + \sum_{Eletrostático} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}}$$

O uso da mecânica molecular torna-se uma ferramenta valiosa no refinamento de estruturas obtidas por métodos experimentais, em simulações de dinâmica molecular (MD), simulações de Monte Carlo e durante os cálculos de ancoragem molecular (ADCOCK *et al*., 2006; POLTEV, 2016).

Simulações de Dinâmica Molecular (MD) são técnicas importantes utilizadas na biofísica computacional, as quais permitem acessar informações a respeito das conformações estruturais adquiridas por proteínas e outras moléculas biológicas em um determinado sistema (LAZIM *et al*., 2020). Essa evolução temporal, também chamada de trajetória, baseia-se em equações de movimento newtoniano (Equação 1.3) onde os átomos são descritas como esféras e interagem por meio da soma dos potenciais descritos pela mecânica molecular calibrados por parâmetros obtidos por métodos experimentais, como a difração eletrônica e de raio-X, RMN, infravermelho, Raman e espectroscopia de nêutrons, sendo a junção dessas equações denominada como campo de força (Equação 1.4) (KOMANDURI *et al*., 2001; GONZÁLEZ, 2011; DROR *et al*., 2012; PAQUET *et al*., 2015).

Equação clássica descrita para o movimento newtoniano de um átomo: (1.3)

$$m\frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} = \frac{d(m\vec{v}_i)}{dt} = \frac{d\vec{p}_i}{dt} = \vec{F}_i$$

Onde, m representa a massa do átomo i na posição $\vec{r}$ se deslocando em uma velocidade $\vec{v}$ e momento $\vec{p}$ com força resultante $\vec{F}_i$ exercida sobre o i-ésimo átomo.

A equação descrita para o campo de força pode ser representado por: (1.4)

$$U_{total} = U_{ligado} + U_{nao\ ligado}$$

Os campos de força se diferem de acordo com os parâmetros adotados, de modo que estes podem não permitir a representação de todos tipos de moléculas (HOSPITAL *et al*., 2015). Atualmente, existe uma variedade de campos de forças parametrizados para simulação de proteínas, e a escolha da função de energia adequada é de suma importância para o sucessso da dinâmica molecular em estudo (ADCOCK *et al*., 2006; GUVENCH *et al*., 2008). Os campos de força utilizados com maior frequência são o CHARMM (BROOKS *et al*., 2009), AMBER (CASE *et al*., 2005), GROMOS (OOSTENBRINK *et al*., 2004), OPLS (JORGENSEN *et al*., 1988) e COMPASS (SUN, 1998), sendo os três primeiros geralmente ideiais para estudar o comportamento estrutural de moléculas biológicas. A descrição matemática para as funções de energia representadas de forma simplificada pelos campos de

força garatem que os cálculos ocorram com uma certa rapidez, mesmo quando aplicados em grandes sistemas (HOSPITAL *et al*., 2015).

Durante a simulação de dinâmica molecular, a força, a velocidade e a posição das partículas são constantementes atualizadas, e as propriedades termodinâmicas como número de partículas, temperatura e pressão podem ser controlados por um conjunto de modelos estatísticos denominados conjunto canônico (com um número constante de partículas, volume e temperatura) e conjunto isotérmico-isobárico (com um número constante de partículas, pressão e volume) (PAQUET *et al*., 2015; GOGA *et al*., 2021). Além disso, algoritmos como *steepest descent* e *conjugate gradient* podem ser empregados para otimizar estruturas moleculares não refinadas por meio de minimizações de energia locais (ADCOCK *et al*., 2006; PAQUET *et al*., 2015).

A representação do sistema em simulação pode adotar diferentes níveis de detalhes. A utilização do modelo *all-atom*, onde todos os átomos da estrutura são explicitados, demonstra melhor capacidade para reproduzir com certa precisão sistemas biológicos, entretanto, essas representações exigem tempo de simulação prolongada e maior custo computacional devido ao maior número de componentes presetnes no sistema (PERLMUTTER *et al*., 2011; HOSPITAL *et al*., 2015). Em contrapartida, a representação do tipo *coarse-grained*, onde os átomos são simplificados de forma a reduzir os graus de liberdade da estrutura e o número de partícula em simulação, leva a redução da precisão do estudo da dinâmica, porém, diminui o custo computacional e o tempo de simulação exigido para fornecer a trajetória (PAK *et al*., 2018; JOSHI *et al*., 2020). A solvatação do sistema também pode ser simplificada, utilizando a representação explícita do solvente ou de forma implícita, onde as moléculas de água são substituídas por propriedades dielétricas do solvente (HOSPITAL *et al*., 2015; PAQUET *et al*., 2015).

Entretanto, as técnicas clássicas de dinâmica molecular amplamente utilizadas no estudo de sistemas biomoleculares são limitadas em dois principais aspectos: a simplificação dos campos de forças e alto custo computacional requerido para observar determinados eventos que necessitam de um tempo de amostragem prolongada (BERNARDI *et al*., 2015). A observação do movimento de alguns domínios protéicos, por exemplo, ou a associação e dissociação de proteínas ocorrem em uma escala de tempo de milissegundos a microssegundos, requerendo simulações longas, acarretando em um alto custo computacional. (YANG *et al*., 2019; LAZIM *et al*., 2020). Outro exemplo são as grandes mudanças

conformacionais apresentadas por complexos biológicos, como no caso da catálise enzimática e o transporte através de membranas, canais e transportadores, onde além da escala do tempo (também ocorre de milissegundos a microssegundos), a transição da energia livre na superfície do complexo, ou seja, a energia necessária para ir de um estado ao outro, se torna um obstáculo durante as simulações de dinâmica molecular clássica (BERNARDI *et al*., 2015; LAZIM *et al*., 2020). Deste modo, aplicação de métodos de amostragem ampliadas são necessários para a otimização do tempo de simulação e maior amostragem dos eventos (YANG *et al*., 2019).

Uma técnica frequentemente utilizada é a simulação de dinâmica molecular direcionada (do inglês *steered molecular dynamics*), na qual uma força é aplicada à parte do sistema, como por exemplo em um ligante, em uma certa direção, sentido e velocidade, superando a barreira energética necessária para um determinado evento físico acontecer, de modo que eventos comumente observados em escalas de tempo muito longas podem ser amostrados com maior rapidez (ISRALEWITZ *et al*., 2001; ADCOCK *et al*., 2006). Simulações de dinâmica molecular direcionada são comumente utilizadas para investigar o processo de dissociação entre duas moléculas, assim como suas respostas à manipulações externas, nas análises de funções mecânicas relacionadas a proteínas como alongamento de fibras musculares (ISRALEWITZ *et al*., 2001), na interação de um receptor de células T (TCR) com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) durante a apresentação de um peptídeo (CUENDET *et al*., 2011) e também no estudo de complexos como proteína-ligante aplicadas ao desenho racional de fármacos (DO *et al*., 2018)

Durante o estudo do processo de desligamento de um sistema receptor-ligante, as múltiplas configurações do sistema entre o estado ligado e o estado não-ligado das duas moléculas definem a coordenada de reação do evento de desligamento do complexo e podem ser obtidas pelo método de dinâmica molecular direcionada, descrito acima (CUENDET *et al*., 2008; MCGIBBON *et al*., 2017).

O método de *Umbrella Sampling* se refere à simulação das configurações que compõem a coordenada de reação. A amostragem conformacional do sistema em cada configuração é realizada por meio da aplicação de restrições posicionais harmônicas ao sistema e de forma independente e cada configuração da coordenada de reação também pode ser denominada como "janela" (DROR *et al*., 2012; PAQUET *et al*., 2015). Porém, este método apresenta como desvantagem o alto custo computacional necessário para a

amostragem conformacional suficiente em todas as janelas, além do tempo requerido na tentativa e erro de determinar o espaçamento mais adequado das janelas de simulação (NOH *et al.,* 2020). A técnica de *Umbrella Sampling* é ideal para o cálculo do *Potential of Mean Force* (PMF) da coordenada de reação em análise, o qual pode ser compreendido com o perfil de energia-livre do processo em estudo (HEADEN *et al.,* 2011; PATEL *et al.*, 2018).

Os detalhes termodinâmicos fornecidos por essas técnicas são importantes para a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular entre duas biomoléculas e podem racionalizar estudos de otimização da afinidade entre duas proteínas. Deste modo, técnicas de dinâmica molecular em conjunto com métodos computacionais de modelagem podem auxiliar no estudo de diversos processos dinâmicos importantes no campo de estudo da bioquímica estrutural, biofísica, enzimologia, biologia molecular, química farmacêutica e biotecnologia, permitindo uma maior compreensão sobre os processos cinéticos e comportamentais de moléculas biológicas, como sua aplicação no estudo da estrutura e função de proteínas (ADCOCK *et al*., 2006; HOLLINGSWORTH *et al*., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver anticorpos monoclonais do tipo scFv otimizados e direcionados à epítopo neutralizante do vírus SARS-CoV-2 por meio de ferramentas de biofísica computacional como estratégia racional para a produção de insumos farmacêuticos aplicados no diagnóstico direto da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a modelagem molecular da estrutura de um anticorpo scFv se ligando a porção RBD do SARS-CoV-2 a partir de moldes disponíveis em bancos de dados de estruturas de proteínas;

- Identificar os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação antígeno-anticorpo;

- Realizar cálculos de mutações sítio-dirigidas para identificar quais resíduos de aminoácidos podem ser otimizados para que ocorra um aumento na interação antígeno-anticorpo;

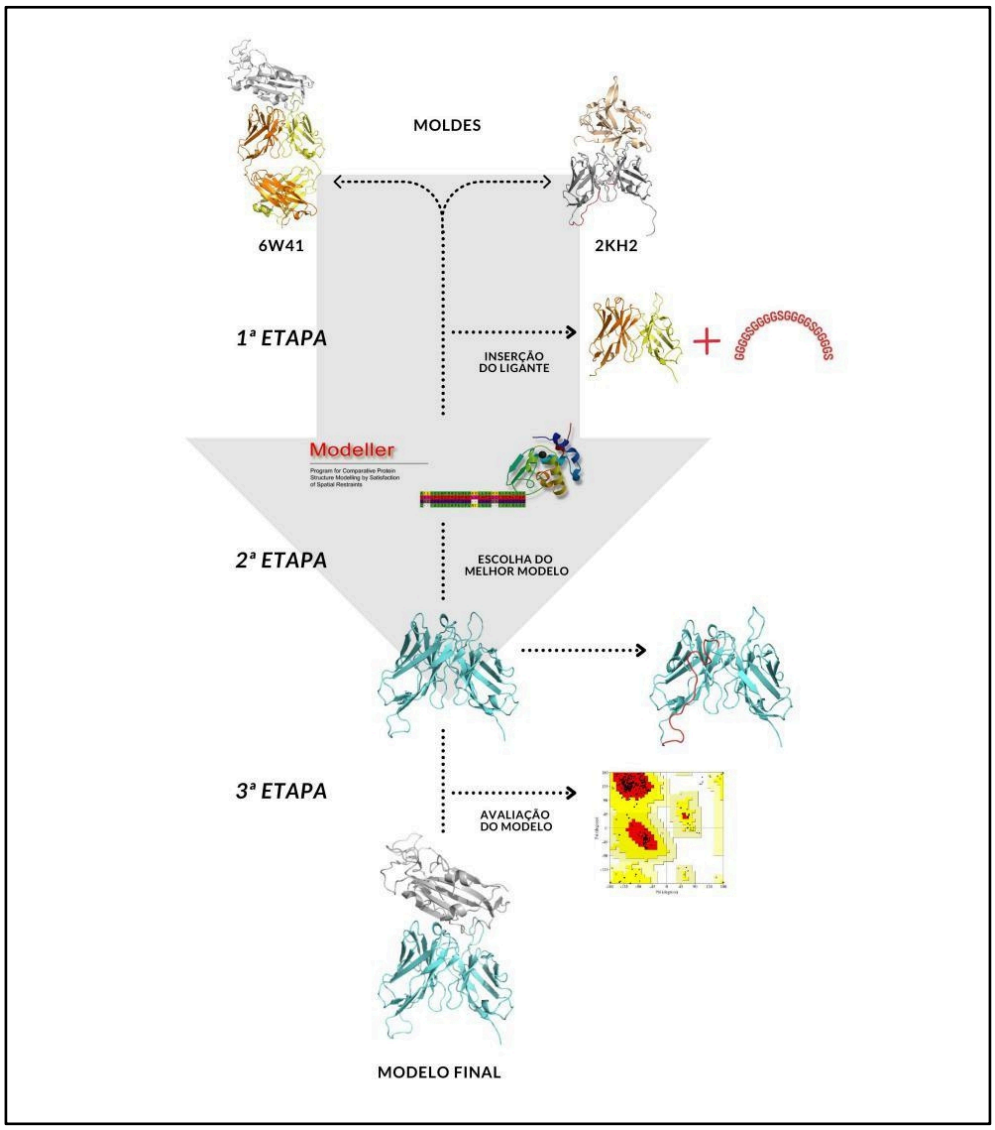
- Realizar simulações de dinâmica molecular para estimar a energia de interação do complexo formado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO DE ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2

A figura 21 apresenta de forma esquemática o processo de construção do modelo de anticorpo scFv anti-RBD-SARS-CoV-2, a qual será detalhada nos subitens deste tópico.

Figura 21 - Método geral esquematizando as principais etapas de construção do anticorpo scFv anti-RBD presente na proteína S do SARS-CoV-2.



A construção do modelo de anticorpo scFv interagindo com a porção RBD do SARS-CoV-2 pode ser resumida em três principais etapas: a pesquisa por moldes e desenho da estrutura primária da proteína (Etapa 1), a modelagem e a escolha do melhor modelo (Etapa 2) e os métodos de validação da estrutura seguido da formação do complexo antígeno-anticorpo (Etapa 3). **Fonte:** Este trabalho.

4.1.1 Pesquisa por estruturas moldes: *Protein Data Bank* (PDB)

A obtenção das estruturas moldes utilizadas no processo de construção do modelo de anticorpo scFv procedeu-se pela varredura no *Protein Data Bank* (PDB) em busca por estruturas de anticorpos interagindo com a porção RBD de vírus pertencentes à família coronavírus e também por estruturas de anticorpos em formato scFv contendo a alça flexível unindo ambas as cadeias da molécula. Para isso, os termos *"antibody"*, "SARS-CoV-2", "*spike protein"*, "COVID-19", *"receptor binding domain"* e "RBD" foram inseridos na interface gráfica do PDB, obtendo como retorno a estrutura PDB ID 6W41 referente a um anticorpo interagindo com a porção RBD do SARS-CoV-2. A pesquisa por estruturas de scFv foi realizada de forma semelhante, utilizando a palavra-chave "scFv" como termo de busca e a seleção da estrutura foi baseada na forma de obtenção do modelo, de modo que o arquivo PDB ID 2KH2 obtido por RMN foi a utilizada para a construção dos novos modelos de anticorpos.

Cabe ressaltar que esse processo foi realizado em abril de 2020, quando pouco ainda se tinha relacionado a estruturas de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2.

4.1.2 Desenho da sequência primária do anticorpo scFv: Clustal Omega

O desenho da sequência primária do anticorpo scFv prosseguiu-se com a inserção da alça flexível na orientação C-terminal da cadeia pesada para a N-terminal da cadeia leve da porção Fv do anticorpo molde (PDB ID 6W41), sendo composto por 20 resíduos de aminoácidos variando entre quatro resíduos de glicinas sequenciais e um resíduo de serina. Em seguida, a sequência desenhada, isto é, a sequência-alvo denominada scFv-CR3022 e mais tarde o anticorpo otimizado scFv MAD22, foram alinhados com as sequências das estruturas moldes (PDB ID 6W41 e PDB ID 2KH2) utilizando a ferramenta Clustal Omega nos parâmetros padrões determinados pelo programa (MADEIRA *et al*., 2019).

4.1.3 Método de modelagem comparativa: MODELLER 10.1

A construção do modelo de anticorpo scFv anti-RBD pertencente ao vírus SARS-CoV-2 foi realizada por meio da técnica de modelagem comparativa pelo servidor MODELLER 10.1 utilizando o método de modelagem baseada em múltiplos moldes

disponível pelo programa (WEBB *et al*., 2016). Para isso, o alinhamento realizado pelo servidor Clustal Omega utilizando as sequências de anticorpos scFv desenhadas foi submetido aos algoritmos do servidor MODELLER em conjunto com as estruturas moldes (PDB ID 6W41 e PDB ID 2KH2) para a construção dos modelos de anticorpo. Os parâmetros utilizados podem ser consultados no ANEXO A.

No total foram gerados 50 estruturas e a escolha do modelo foi baseada no melhor valor DOPE (do inglês *Discrete Optimized Protein Energy*) apresentada pelas estruturas modeladas (SHEN *et al*., 2006).

4.1.4 Processo de validação do modelo: ProSA-web, PROCHEK, VERIFY3D e ERRAT

A estrutura escolhida pelo melhor valor de DOPE referente aos modelos de anticorpos scFv-CR3022 e scFv MAD22 foram analisadas quanto ao desvio da energia obtida entre os modelos e outras proteínas depositadas no PDB, os resíduos de aminoácidos presentes em regiões energeticamente favoráveis e aqueles não favoráveis visualizadas pelo gráfico de Ramachandran, a relação entre a estrutura tridimensional e sua sequência primária e possíveis regiões com interações atômicas incorretas, por meio dos servidores de validação de estruturas tridimensionais preditas computacionalmente: ProSA-web (do inglês *Protein Structure Analysis*) (WIEDERSTEIN *et al*., 2007), PROCHECK (LASKOWSKI *et al*., 1993), VERIFY3D (EISENBERG *et al*., 1997) e ERRAT (COLOVOS *et al*., 1993), respectivamente. Para isso, as estrutura foram submetidas a plataforma do ProSA-web e do SAVESv6.0, onde está situado as ferramentas PROCHEK, VERIFY3D e ERRAT.

4.1.5 Cálculo da raiz do desvio quadrático médio (RMSD)

O cálculo da raiz do desvio quadrático médio (RMSD do inglês *Root Mean Square Deviatio*n) é uma medida quantitativa da similaridade entre as coordenadas atômicas apresentada pelo modelo criado e aquelas presente no molde, podendo ser expressa pela equação 2.0 (DAMM *et al*., 2006).

$$\mathrm{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i-1}^{N} \delta_i^2} \qquad (2.0)$$

Onde *N* é o número de pares de átomos equivalentes localizados na estrutura das proteínas que estão sendo comparadas e δ é a distância de cada átomo *i* de uma molécula em relação ao seu semelhante presente na estrutura referência. Nessa vertente, um conjunto de átomos representados pelas letras *a* e *b* situados na posição *i* de uma proteína em estudo a uma distância δ pode ser entendida como:

$$\mathrm{RMSD}(a,b) = \sqrt{\frac{1}{2}\sum_{i-1}^{2}((a_i - b_i)^2)} \tag{2.1}$$

O somatório de 1 até *N* para o conjunto $a = (a_{ix}, a_{iy}, a_{iz})$ e $b = (b_{ix}, b_{iy}, b_{iz})$ considera o eixo de coordenada tridimensional *xyz* para cada átomo, como representado pela equação 2.2:

$$\delta_i^2 = (a_{ix} - b_{ix})^2 + (a_{iy} - b_{iy})^2 + (a_{iz} - b_{iz})^2 \tag{2.2}$$

Deste modo, substituindo a equação 2.2 na equação 2.1 obtemos o cálculo do RMSD para um sistema composto pelos átomos *a* e *b* expressa pela equação 2.3:

$$\mathrm{RMSD}(a,b) = \sqrt{\frac{1}{2}\sum_{i-1}^{2}((a_{ix} - b_{ix})^2 + (a_{iy} - b_{iy})^2 + (a_{iz} - b_{iz})^2)} \tag{2.3}$$

O cálculo pode ser realizado por meio da plataforma gráfica de visualização de estruturas tridimencional PyMOL (YUAN *et al*., 2017), onde o processo apresenta duas principais etapas, as quais envolve o alinhamento e a superposição da estrutura alvo em relação a sua referência por meio da rotação e translação da molécula (COUTSIAS *et al*., 2019).

4.1.6 Obtenção do complexo scFv-RBD

A criação do complexo scFv-RBD foi alcançada pelo processo de transposição do antígeno presente no molde para o modelo produzido utilizando a interface do servidor PyMOL (YUAN *et al*., 2017).

4.2 MAPEAMENTO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DO PARATOPO DO scFv E CARACTERIZAÇÃO DA NATUREZA DE INTERAÇÃO NO RECONHECIMENTO DO ANTÍGENO

O estudo dos resíduos de interface do anticorpo scFv, bem como a caracterização das formas de reconhecimento frente ao antígeno, ocorreu por meio de três etapas: minimização de energia do sistema (Etapa 1), seguido da caracterização do paratopo do anticorpo (Etapa 2) e identificação das interações atômicas predominantes (Etapa 3).

4.2.1 Minimização de energia do complexo antígeno-anticorpo: YASARA

A minimização de energia pelo servidor YASARA (*Yet Another Scientific Artificial Reality Application*) foi realizada com o objetivo de revelar possíveis interações formadas entre o complexo anticorpo scFv e a proteína RBD do SARS-CoV-2. Para isso, as estruturas de anticorpos scFv foram submeditas à ferramenta YASARA *Energy Minimization Server* situada dentro da plataforma e visualizada pelo servidor YASARA *View*. O programa utiliza-se de equações descritas pelo campo de força AMBER (CORNELL *et al*., 1995) em conjunto com conhecimentos multidimensionais baseados em potenciais de torção conhecidos e uma série de parâmetros como interações eletrostáticas e ligações hidrofóbicas. Nessa vertente, o campo de força YASARA promove mudanças aleatórias em um ou mais parâmetros (em um certo raio de Van der Waals, em uma carga ou um potencial), minimizando a energia baseado em um conjunto de estruturas de alta resolução obtida por raio-X, e descartando ou aceitando as alterações ocorridas por meio do método de Monte Carlo (KRIEGER *et al*., 2009).

4.2.2 Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presentes na interface do anticorpo scFv: PRODIGY e PISA

O mapeamento dos resíduos de aminoácidos interfaciais prosseguiu-se por meio de duas metodologias: a primeira abordagem ocorreu pelo servidor PRODIGY e a segundo utilizando o servidor PISA. Deste modo, os resíduos identificados por ambos os métodos foram selecionados para as próximas etapas de otimização do anticorpo scFv.

4.2.2.1 PRODIGY: *Protein Binding Energy*

O complexo antígeno-anticorpo minimizado (scFv-CR3022-RBD e scFv MAD22-RBD), foi submetido a plataforma gráfica do PRODIGY (do inglês ***PRO**tein bin**DI**ng ener**GY***) para a determinação dos resíduos de aminoácidos presentes na interface de ligação ao antígeno localizada na porção Fv do anticorpo (XUE *et al*., 2016). A proteína RBD e o anticorpo scFv foram identificados como *Interactor* 1 e 2, respectivamente, e os cálculos foram realizados sob a temperatura de 25°C, como o padronizado pelo servidor.

4.2.2.2 PISA: *Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*

Os complexos scFv-CR3022-RBD e scFv MAD22-RBD foram submetidos a plataforma gráfica do PISA (do inglês *Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*) para também determinar os resíduos de aminoácidos presentes na interface de ligação ao antígeno. Porém, este servidor disponibiliza tanto a porcentagem da estrutura acessível ao solvente quanto para aquelas escondidas durante o processo de dobramento da proteína. Além disso, a plataforma disponibiliza possíveis interações iônicas e ligações de hidrogênio formadas entre o antígeno e o anticorpo. A lista dos parâmetros utilizados pelo PISA pode ser consultado no endereço: https://www.ebi.ac.uk/pdbe/docs/Tutorials/workshop_tutorials/PDBepisa.pdf

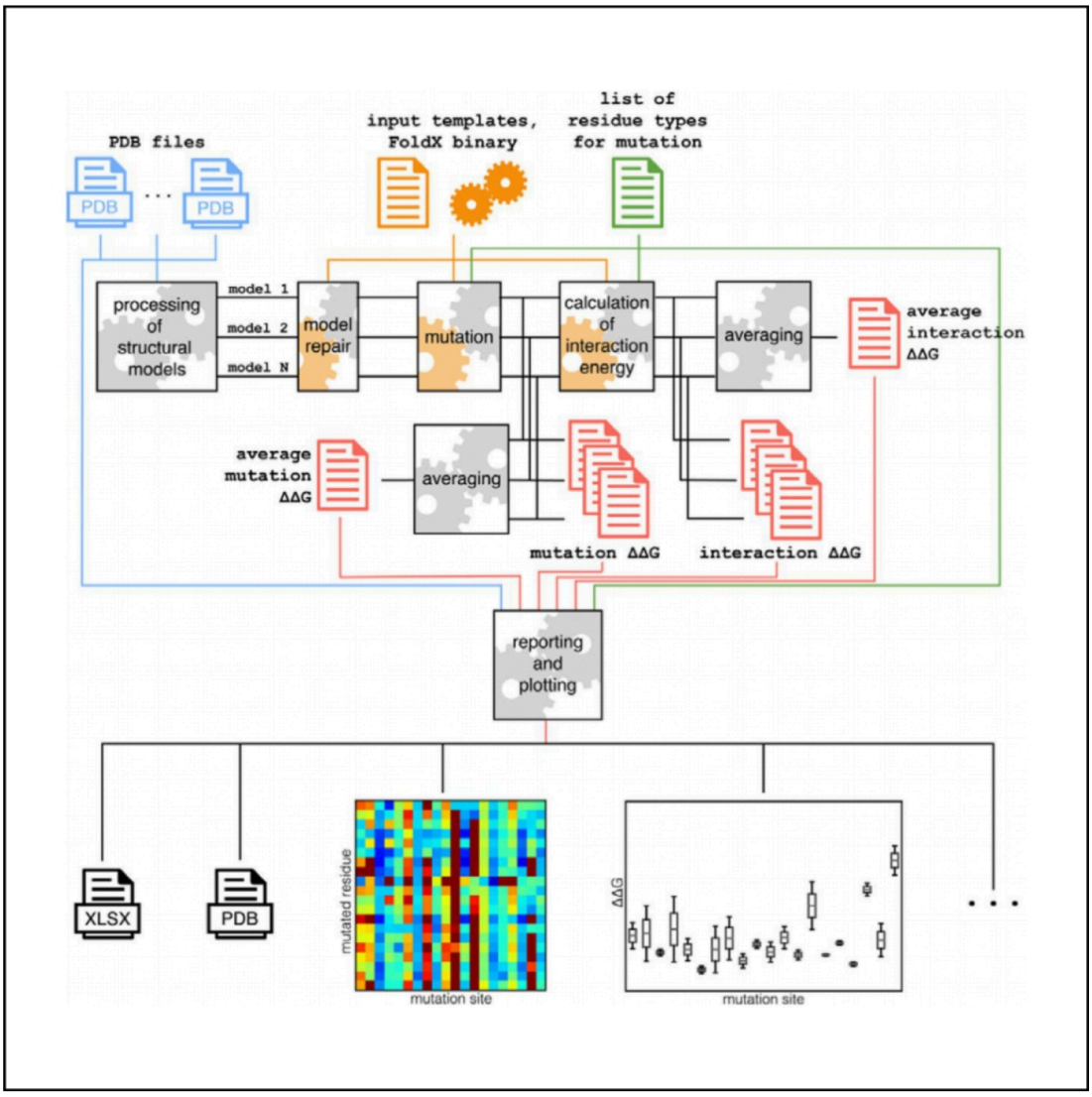
4.2.3 Caracterização da natureza de interação envolvida no reconhecimento do antígeno pelo anticorpo scFv: PIC

Os complexos scFv-CR3022-RBD e scFv MAD22-RBD foram submetidos a plataforma gráfica do PIC (do inglês *Protein Interactions Calculator*) para a determinação da natureza de interação existente entre o antígeno e o anticorpo. A plataforma permite estabelecer valores para as distâncias de interações de forma personalizada. Desse modo, os valores de *cut-off* para interações hidrofóbicas foi padronizado em até 5.0 Å e para ligações de hidrogênio em até 3.0 Å, para ligações iônicas e interações cátion-π o valor de referência foi ajustada para distâncias em até 6.0 Å, para interações aromático-enxofre os valores estabelecidos foram de 5.3 Å e para empilhamento do tipo π-π esse valor foi definido para distâncias que variam de 4.5 Å a 7.0 Å. Em seguida, os resultados obtidos foram conferidos manualmente, de forma que os valores preditos pelo programa foram os mesmo observados medindo as distâncias interatômicas pela plataforma PyMOL.

4.3 CÁLCULOS DE MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS: MUTATEX

Os resíduos de aminoácidos previamente identificados foram alvos de uma série de mutações sítio-dirigidas realizadas pelo programa MutateX (TIBERTI *et al*., 2019). Este método emprega a função de energia do algoritmo FoldX (Schymkowitz *et al*., 2005; BUß *et al*., 2018) de forma automatizada para predizer os valores da variação da variação da energia livre de Gibbs (ΔΔG) associadas à mutações realizadas em cada resíduo de aminoácido. A figura 22 representa o fluxo do processo executado pelo servidor de acordo com as especificações obtidas pelo próprio programa.

Figura 22 - MutateX: mutações sítio-dirigidas.



Desenho esquematizado do fluxo do processo utilizado pelo MutateX para o cálculo das mutações sítio-dirigidas.
Fonte: Tiberti *et al*. (2019).

Como ilustrado, o processo inicial requer a entrada do arquivo contendo as coordenadas estruturais do modelo no formato de leitura exigida pelo MutateX (PDB) e os documentos necessários para realização dos cálculos pelo algoritmo FoldX. Em seguida, este arquivo é reescrito pelo servidor de forma que para cada resíduo de aminoácido presente na estrutura um modelo em formato PDB é gerado e usado na etapa de reparação pelo FoldX. Nesta etapa, ocorre a otimização da energia da proteína com a finalidade de remover possíveis choques interatômicos ou alterar a conformação de resíduos não favoráveis estereoquimicamente contidos no arquivo de entrada. Além disso, no decorrer do processo também são gerados os documentos necessários para a realização da varredura mutacional, como o arquivo de chamada do FoldX e a listas contendo os resíduos de aminoácidos que serão usados durante a mutação. Na etapa seguinte, dá-se início ao processo de mutação realizado na estrutura da proteína, onde cada substituição em um determinado resíduo é tratado como independente pelo FoldX, sendo executada de forma automatizada pelo MutateX. Deste modo, um modelo de proteína mutada é gerado em conjunto com seu correspondente *wildtype,* seguido do cálculo da diferença da variação de energia existente entre elas, descrita pela equação 3.0.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{wildtype} - \Delta G_{mutante}\ [kcal\ mol^{-1}] \tag{3.0}$$

Nessa vertente, uma sequência de combinações de funções empíricos são usados para estimar a variação de energia livre de Gibbs (ΔG) associada a cada modelo, como representado pela equação 3.1.

(3.1)

$$\Delta G = a\Delta G_{vdw} + b\Delta G_{solvH} + c\Delta G_{solvP} + d\Delta G_{wb} + e\Delta G_{hbond} + f\Delta G_{el} + g\Delta G_{kon} + hT\Delta S_{mc} + kT\Delta S_{sc} + l\Delta G_{clash}$$

Onde ΔG_{vdw} corresponde a energia atribuída à força de Van der Waals originada das interações entre os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da molécula; ΔG_{solvH} e ΔG_{solvP} representam os termos relacionados à energia de dessolvatação de grupamentos hidrofóbicos e polares, respectivamente, durante o processo de dobramento da proteína; ΔG_{wb} é o termo associado ao cálculo da energia entre moléculas de águas ligadas fortementes às proteínas; ΔG_{hbond} se refere ao termo utilizado para calcular as ligações de hidrogênio presentes na estrutura, baseado na geometria e na energia atribuída a esse tipo de interação;

ΔG_{el} representa a função a qual analisa as contribuições eletrostáticas associada à energia livre da proteína durante o processo de enovelamento por meio da aplicação da lei de Coulomb; ΔG_{kon} termo utilizado para calcular a energia necessária para a formação de complexos protéicos por meio do cálculo da força eletrostática presente na interface de interação das moléculas; ΔS_{mc} e ΔS_{sc} são as funções relacionadas ao custo entrópico necessário para fixar o arcabouço protéico e as cadeias laterais, respectivamente, em uma determinada conformação; ΔG_{clash} se refere a energia atribuída aos impedimentos estéricos causados pelos átomos presentes na estrutura da proteína.

A varredura virtual de mutações no paratopo do anticorpo realizada pelo programa MutateX, fornece resultados dispostos em mapas de calor e também em dados quantitativos referentes ao valor de $\Delta\Delta G$ do resíduo de aminoácido mutante. Estes valores obtidos pelo programa variam em uma escala de 5 a -3 $kcal.mol^{-1}$. Para a construção do modelo do anticorpo otimizado, valores de $\Delta\Delta G \leq -1$ $kcal.mol^{-1}$ foram considerados para escolha do resíduo de aminoácido mutante visando o ganho de interações com o antígeno. Após esta etapa, realizou-se construção do modelo do anticorpo scFv otimizado (i.e. contendo todas as mutações preditas como potencializadoras de interação) pela mesma metodologia descrita acima, sendo posteriormente alinhada com o anticorpo do complexo original para obtenção da estrutura completa da interação antígeno-anticorpo. O FoldX também dispõe de ferramentas para estimar a energia livre de interação entre duas moléculas, como mostrado pela figura 22.

4.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR.

O complexo de anticorpos scFv interagindo com a porção RBD da proteína *Spike* do vírus foi simulado por meio do pacote GROMACS 2018.6, programa de dinâmica molecular desenvolvido para simulações de macromoléculas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (ABRAHAM *et al*., 2015; BERENDSEN *et al*., 1995). O preparo da topologia do sistema foi realizado utilizando o campo de força AMBER99SB-ILDN, seguido pela construção da caixa de simulação de formato retangular nas dimensões 9x16x9 nm^3, onde o complexo antígeno-anticorpo foi centralizado nas coordenadas 4.5 nm, 5.0 nm, 4.5 nm. A localização do complexo na caixa se faz essencial para que durante as simulações de dinâmica molecular direcionada (do inglês *Steered Molecular Dynamics*), a porção RBD se desligue completamente do anticorpo scFv sem que esta se extravase pelas laterais da caixa. Deste modo, o sistema foi posteriormente preenchido com água TIP3P (HARRACH *et al*., 2014),

com acréscimo de íons Na^+ e Cl^- na concentração de 0,15 M cujo objetivo é promover a neutralização da carga líquida do sistema em pH 7,0. Após o preparo do sistema, uma série de cálculos de minimização de energia foi realizada para que haja a correção de contatos desfavoráveis na estrutura da proteína e a adaptação do solvente ao redor desta. Estes cálculos foram realizados seguindo duas metodologias, sendo a primeira de acordo com o método *Steepest Descent*, e a segunda pelo o algoritmo *Conjugate Gradient.*

Em seguida, foi realizada a equilibração do sistema durante 500 ps onde manteve-se o número de partículas, o volume e a temperatura constante (NVT), à 298K, por meio de um termostato V-rescale (tau_t = 0.1 ps). Além disso, restrições espaciais foram impostas aos átomos pertencentes à estrutura da proteína e as interações de longo alcance, de 1.2 nm de distância, como potencial de Coulomb e interações de Lennard-Jones, foram contornadas pelo emprego do algoritmo PME (do inglês *Particle Mesh Ewald*) (DARDEN *et al*., 1993). Logo após, o sistema foi novamente equilibrado por 500 ps, porém mantendo o número de partículas, a pressão e a temperatura constante (NPT), à 1 bar, por meio do uso do barostato Parrinello-Rahman (tau_p = 2 ps). O tempo de integração utilizado na simulação foi de 2 fs, devido ao emprego do algoritmo LINCS (HESS *et al.,* 1997). Ao término desse processo, simulações de dinâmica molecular direcionada foram realizadas com auxílio do *plugin* PLUMED 2.5 (BONOMI *et al*., 2009; THE PLUMED CONSORTIUM, 2019) junto ao pacote GROMACS 2016. Esta metodologia fornece as configurações ao longo do processo de desligamento do complexo antígeno-anticorpo necessárias para o uso da técnica de *Umbrella Sampling*. Para isso, a escolha da variável de tração foi definida como a distância entre o centro de massa de ambas proteínas e a força aplicada foi de 1000 kJ/mol durante um intervalo de tempo correspondente a 900 ps. Foram selecionadas configurações entre 3,5 nm (estado ligado) até 7,0 nm (estado desligado), espaçadas em 0,1 nm entre si, num total de 16 configurações.

Em seguida, o cálculo do *Potencial Mean Force* (PMF), propriedade que descreve a energia de desligamento do complexo antígeno-anticorpo, foi realizado por meio do método de *Umbrella Sampling* utilizando as configurações obtidas anteriormente. O complexo foi simulado por 50 ns em cada uma das 16 janelas (3.5 - 7.0 nm). No total, o tempo de simulação para todos complexos (4 controles e 4 protótipos) foi de 6,4 μs. A diferença de energia entre o estado ligado e o estado ao longo do PMF é a energia livre de Gibbs (ΔG) (YOU *et al.,* 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

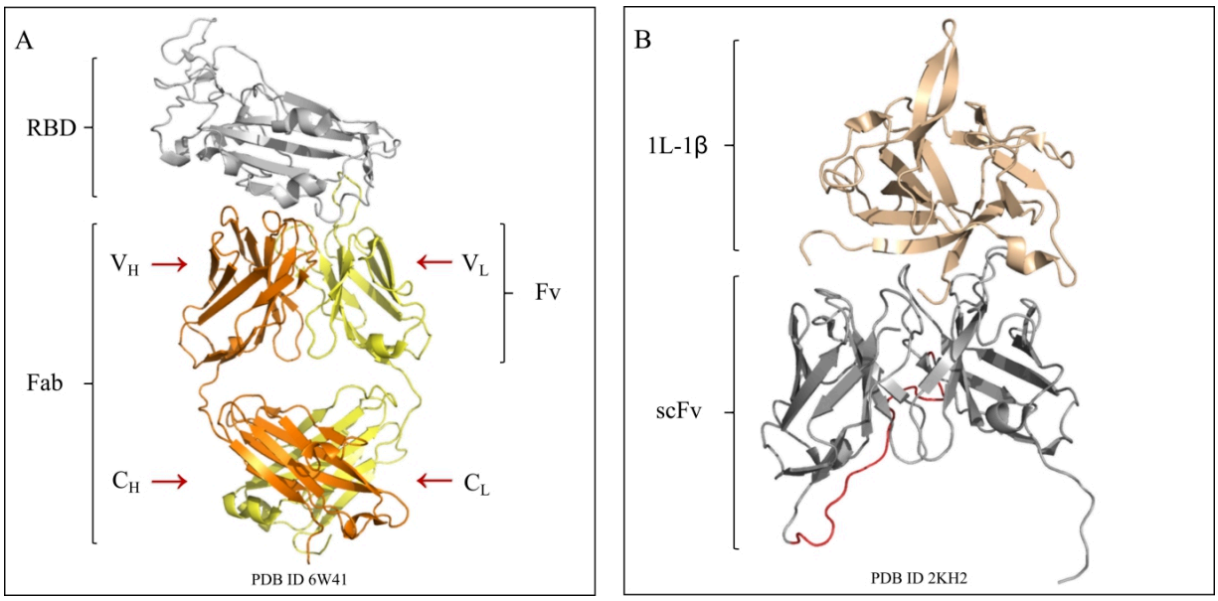
5.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO DO ANTICORPO scFv ANTI-RBD-SARS-CoV-2

Após a varredura virtual por moldes disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), duas estruturas foram consideradas para a produção do modelo antígeno-anticorpo. O primeiro molde se refere ao arquivo PDB ID 64W1 (YUAN *et al*., 2020), estrutura obtida pela técnica de difração por raio-X referente a porção Fab do anticorpo neutralizante CR3022 interagindo com a proteína antigênica RBD do SARS-CoV-2. Este anticorpo foi isolado de soro convalescente de pacientes apresentando a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) causada pelo SARS-CoV entre os anos de 2002 e 2003 na China, sendo empregado como uma das terapias de urgência no controle do agravamento de pacientes portadores da COVID-19 (Figura 23a). O segundo arquivo é a estrutura do complexo anticorpo scFv-IL-1β identificado pelo código PDB ID 2KH2 (WILKINSON *et al*., 2009), obtido pelo método de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo sua escolha baseado na presença de uma alça formada por resíduos de glicina e serina unindo ambas as cadeias da porção variável do anticorpo, a qual auxilia no tamanho necessário para preservar a flexibilidade existente entre os domínios (Figura 23b).

A sequência de anticorpo scFv-CR3022 desenhada foi alinhada às estruturas moldes por meio do servidor Clustal Omega, o qual promove o alinhamento múltiplo de sequências baseado na metodologia de alinhamento progressivo, ou seja, durante a fase de alinhamento os algoritmos empregados pelo servidor procuram por sequências que apresentam menor relação evolutiva entre si criando uma topologia denominada “árvore guia”, a qual servirá para direcionar a ordem do alinhamento baseando nesta filogenia originada (SIEVERS et al., 2011; SIEVERS et *al*., 2017).

Os documentos relacionados a criação da sequência primária do anticorpo scFv-CR3022 assim como o alinhamento entre as estruturas se encontram no APÊNDICE A.

Figura 23 - Estruturas moldes usadas na construção da scFv anti-RBD do SARS-CoV-2.



(A) Cristal da porção Fab do anticorpo CR3022 (PDB ID 6W41) interagindo com a RBD do SARS-CoV-2 (branco), destacando a cadeia pesada (laranja) e a cadeia leve (amarelo) do anticorpo. **(B)** Estrutura de um anticorpo scFv (cinza) interagindo com a proteína IL-1β (marrom claro) demonstrando a posição da alça flexível (vermelho) unindo as duas cadeias do anticorpo (PDB ID 2KH2). Fab: *Fragment antigen-binding;* Fv: *Fragment variable*; V_H e V_L: *Heavy and Light chain of variable domain*; C_H e C_L: *Heavy and Light chain of constant domain.* **Fonte:** Este trabalho.

Em seguida, o alinhamento realizado foi utilizado para modelar as estruturas de anticorpos scFv utilizando o servidor MODELLER 10.1. Esse servidor emprega algoritmos de satisfação de restrições espaciais o qual transferem as coordenadas cartesianas e internas dos átomos presentes na estrutura da proteína molde para a sequência alvo em estudo. Nessa vertente, as restrições homólogas relacionadas a distância entre carbono-α (Cα) e ângulos torcionais (diedros) da cadeia principal são obtidas a partir da estrutura tridimensional da proteína molde e transferidas para a sequência alvo por meio do alinhamento estrutural entre elas, seguido do emprego de cálculos de restrições espaciais, o qual tem por objetivo ajustar a estereoquímica da molécula utilizando os parâmetros presentes no campo de força CHARMM22, e por fim, ocorre a otimização da estrutura para a obtenção do modelo final (SALI et al., 1993; FISER et al., 2000; MARTÍ-RENOM et al., 2000; WEBB et al., 2016).

Ao término do processo de modelagem, foram gerados ao todo 50 modelos de anticorpo scFv, onde a escolha da melhor estrutura baseou-se no menor valor de DOPE

alcançado pela molécula. Em seguida, o modelo foi avaliado e validado quanto a qualidade da estrutura, sendo os resultados obtidos sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 - Processos de validação da estrutura do anticorpo em formato scFv-CR3022.

Ramachandran Plot				ProSA-web Z-score	ERRAT Overall quality factor (%)	Verify3D % dos resíduos com pontuação 3D-1D ≥ 0,2
Resíduos nas regiões mais favorecidas (%)	Resíduos em regiões adicionais permitidas (%)	Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	Resíduos em regiões não permitidas (%)			
90,2%	9,8%	0,0%	0,0%	-6,78	76,82	100,0%

Os servidores utilizados avaliaram a qualidade energética do modelo (ProSA-web), estereoquímica (PROCHECK), relação estrutura 3D-1D (VERIFY3D) e interações atômicas incorretas (ERRAT). **Fonte:** Este trabalho.

A estrutura modelada demonstrou o valor de Z-score equivalente a -6,78, isto é, o modelo se encontra localizado dentro da faixa de pontuação de proteínas com o mesmo peso molecular e elucidadas pelo método de RMN, indicando uma boa qualidade da estrutura proteica. Além disso, as análises realizadas pelo ProSA-web mostraram que a maioria dos resíduos se encontram em regiões de baixas energias, assegurando a qualidade do modelo (WIEDERSTEIN *et al*., 2007; SADDALA *et al*., 2017; WADANAMBI, 2020). Os gráficos gerados pelo servidor podem ser consultados no APÊNDICE B.1.

O servidor ProSA-web utiliza cálculos baseados no potencial de força média da estrutura para estimar a qualidade do modelo. O método é capaz de identificar erros no enovelamento de proteínas ou se essas apresentam regiões mal dobradas, por meio das características energéticas contidas nas interações intramoleculares entre dois resíduos de aminoácidos em função do distanciamento espacial entre os átomos associados a cada resíduo. Além disso, o servidor emprega um segundo potencial responsável para estimar a energia relacionada a interação entre os resíduos de aminoácidos expostos e o solvente, aplicando o princípio inverso de Boltzmann, o qual efetua os cálculos baseados em parâmetros obtidos de estruturas de proteínas elucidas experimentalmente. Os resultados obtidos após os cálculos são expressos por meio de um gráfico de energia em função da localização dos resíduos de

aminoácido presente na estrutura e também pelo valor do Z-score demonstrado pela proteína em análise (SIPPL, 1993a; SIPPL, 1993b; WIEDERSTEIN *et al*., 2007).

Os resultados obtidos pela a análise do perfil estereoquímico da estrutura realizado pelo servidor PROCHECK demonstrou a presença de 90,2% dos componentes da estrutura em regiões mais favoráveis, equivalente a 184 resíduos de aminoácidos, e 9,8% em regiões permitidas, sendo um total de 20 resíduos de aminoácidos. Não foram encontrados resíduos em regiões pouco favorecidas ou não permitidas, demonstrando uma excelência na qualidade do modelo. Resíduos de glicina e prolina apresentam comportamentos diferentes quando submetidos a análises pelo método de Ramachandran daquele observado para os outros 18 aminoácidos. Isto se deve às características estruturais presentes nos dois resíduos, onde o primeiro é composto pelo Cα aquiral, tendo em sua cadeia lateral um átomo de hidrogênio, o qual aumenta as probabilidades de conformações adotadas pelo resíduo devido ao aumento da flexibilidade da região onde está inserido, e o segundo apresenta um anel heterocíclico pirrolidino em sua cadeia lateral, restringindo as conformações adotadas pela região onde está localizado (LOVELL *et al*., 2003; CARUGO *et al*., 2013). Na estrutura do modelo de anticorpo scFv-CR3022 foram observados 40 resíduos de glicina e 11 resíduos de prolina, sendo todos encontrados em conformações estereoquímicas favoráveis. Os gráfico de Ramachandran gerado para esses resíduos podem ser consultados no APÊNDICE B.3.

O servidor PROCHECK emprega parâmetros estereoquímicos provenientes dos estudos realizados por Morris *et al*., (1992), onde os pesquisadores obtiveram as coordenadas geométricas relacionadas aos ângulos de torsão φ, ψ e χ a partir de estruturas de proteínas elucidadas pelo método de cristalografia e difração por raio-X. Além disso, o servidor também utiliza de informações a respeito dos comprimentos e ângulos de ligações presentes nessas moléculas, os quais foram derivados de pesquisas estatísticas por meio de proteínas depositadas em bancos de dados de estruturas (ENGH *et al*., 1991; MORRIS *et al*., 1992; LASKOWSKI *et al*., 1993; HOLLINGSWORTH *et al*., 2010)

O modelo de anticorpo scFv-CR3022 também foi analisado quanto a compatibilidade existente entre a estrutura tridimensional (3D) modelada e sua sequência primária (1D) pelo servidor Verify3D (DASARI *et al*., 2016). O resultado obtido demonstrou que 100% dos resíduos se encontram em regiões permitidas pela relação 3D-1D, isto é, os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura modelo obtiveram pontuações ≧ 0,2, sendo este valor

característicos de estruturas elucidadas por métodos experimentais (TRAN *et al*., 2015; KUMAR *et al*., 2019) (APÊNDICE B.5).

Os cálculos realizados pelos algoritmos do servidor Verify3D caracterizam os resíduos de aminoácidos presentes no modelo em análise atribuindo-os a uma classe estrutural de acordo com sua localização e seu ambiente químico (NAGARAJAN *et al*., 2017). Nesta vertente, o servidor promove uma varredura pela sequência primária da proteína com o objetivo de verificar a compatibilidade existente entre o resíduo de aminoácido e seu local no modelo tridimensional, isto é, se estes se encontram em regiões expostas ao solvente ou escondidos em ambientes hidrofóbicos de acordo com as características físico-químicas individuais de cada resíduo. Os algoritmos também analisam a frequência destes em regiões desenoveladas como as alças, ou se os mesmos são responsáveis por formar estruturas mais ordenadas como as folhas betas e alfa hélices. Em seguida, uma matriz de pontuação é gerada e comparada com as de proteínas cuja estrutura terciária são bem estabelecidas, utilizando-as como um perfil de referência. Os resultados gerados pelo servidor são representados por um gráfico onde o valor obtido para cada um dos resíduos de aminoácidos é expresso em um intervalo o qual varia de -1 a +1, sendo os resíduos que se encontram próximo ao valor de 0,0 considerados com baixa precisão de predição ou apresentam conformação menos estável (BOWIE *et al*., 1991; EISENBERG *et al*., 1997; JAIN *et al*., 2014; LAKHLILI *et al*., 2015).

O último processo de validação do modelo de anticorpo scFv-CR3022 baseou-se na análise das interações entre átomos não ligados, realizado pelo programa ERRAT. O resultado expresso em porcentagem equivalente ao fator da qualidade geral do modelo demonstrou que 76,82% dos resíduos de aminoácidos estão abaixo do limite de rejeição estipulado pelo servidor, indicando uma boa qualidade da estrutura (APÊNDICE B.7).

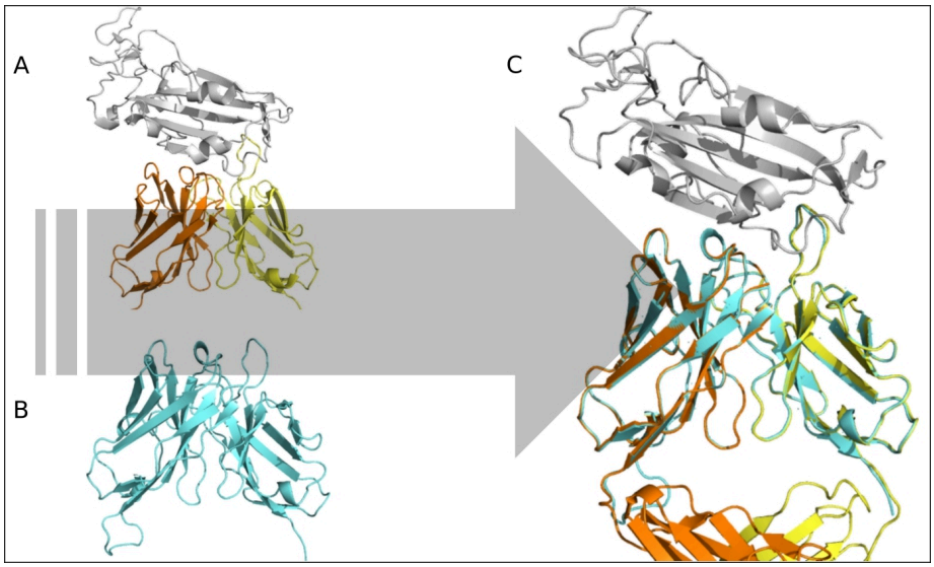
O programa ERRAT calcula o perfil de interações não covalentes formadas por diferentes átomos presentes na estrutura proteica com base nas interações atômicas características vistas para proteínas elucidadas experimentalmente. Os algoritmos levam em consideração três tipos de átomos durante as análises (C, N e O), podendo então ser formado apenas seis tipos de interações intramolecular observadas na proteína dobrada e que são entendidas pelo programa: CC, CN, CO, NN, NO e OO (COLOVOS *et al*., 1993). Além disso, o servidor parte da premissa que a complexidade geométrica e energética presentes durante o processo de enovelamento impõe um certo padrão de interação entre os átomos, não apresentando distribuição randômica destes na cadeia da proteína, e que erros estruturais

levariam a uma perturbação desse padrão de interação (COLOVOS *et al*., 1993; SADDALA *et al*., 2017; HASHEMZADEH *et al*., 2019). Deste modo, os resíduos de aminoácidos do modelo localizados em zonas problemáticas mostradas pelo gráfico do ERRAT foram identificados na estrutura tridimensional da proteína como os responsáveis pela formação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs do inglês *complementarity-determining regions*) presentes no paratopo do anticorpo, o qual caracteriza-se por terminações em conformação beta seguido de estruturas altamente desordenadas, os *loops*, sendo esses responsáveis pela interação com o antígeno. A flexibilidade apresentada pelos *loops* e os desafios impostos na sua caracterização durante a elucidação de estruturas de proteínas por meio experimental, dificultam o acesso de informações relacionados ao perfil de interação atômica nas regiões onde estão envolvidos (TANG *et al*., 2014; KARAMI *et al*., 2018).

Saddala *et al*. (2017) relataram a alta porcentagem de erros apresentada pelo servidor ERRAT em regiões formadas por *loops* em seu modelo. Segundo os autores, esses resultados já eram esperados devido a falta dessas estruturas no molde utilizado para gerar o modelo proteico estudado por eles. Esse dado corrobora com a região espaçada encontrada entre os resíduos 120 e 140 representada no gráfico gerado para o modelo scFv-CR3022, o qual corresponde o local onde fora inserido a alça de glicina e serina unindo ambas as cadeias do anticorpo. Além disso, as análises das interações formadas entre átomos não ligados estão sujeitas a algumas restrições, como interações menores do que 3,5 Å de distância ou ainda as interações entre os átomos do mesmo resíduo ou aqueles ligados convalentementes (COLOVOS *et al*., 1993; SADDALA *et al*., 2017).

Após a etapa de validação, o modelo gerado foi alinhado ao cristal PDB ID 6W41 pela plataforma PyMOL para o cálculo da raiz do desvio quadrático médio, o qual representa a similaridade estrutural apresentada entre o modelo e o molde. O valor de RMSD obtido para o anticorpo scFv-CR3022 foi equivalente a 0.152 Å de distância (Figura 24). Esse valor aumenta à medida em que duas estruturas analisadas se mostram diferentes durante sua superposição, de modo que valores iguais a 0.0 Å caracterizam moléculas idênticas. Nessa vertente, o resultado obtido para o modelo de anticorpo scFv-CR3022 assemelha-se em similaridade com o molde utilizado na criação do modelo, conferindo qualidade a estrutura (CARUGO *et al*., 2008).

Figura 24 - Alinhamento estrutural obtido pelo cálculo do RMSD entre o cristal e o modelo scFv-CR3022.

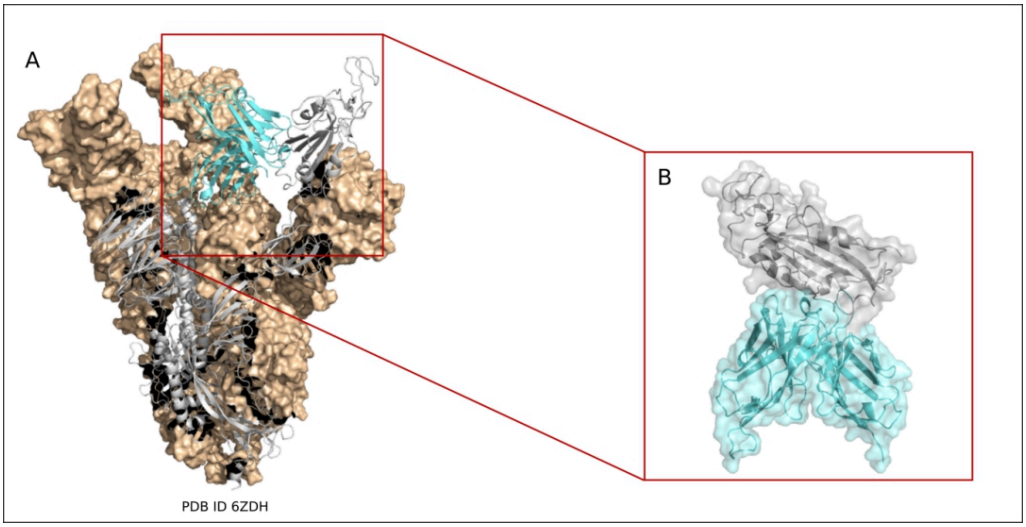


(A) Porção Fv do cristal PDB ID 6W41. **(B)** Modelo de anticorpo scFv-CR3022. **(C)** O alinhamento estrutural entre a porção Fab do cristal PDB ID 6W41 e o modelo de anticorpo scFv-CR3022 demonstrou valor de RMSD = 0.152 Å, indicando alto grau de similaridade entre as proteínas. **Fonte:** Este trabalho.

A análise comparativa entre duas proteínas pela equação do RMSD tem como problemática a superposição de estruturas que se diferem em números de átomos, o qual reflete diretamente no tamanho da molécula, normalmente o cálculo realizado considera apenas o Cα presente no arcabouço da proteína ou em um subconjunto específico, como por exemplo as hélices transmembranares, ou ainda apenas os átomos pesados da estrutura de cada resíduo de aminoácido. Além disso, a superposição de proteínas constituídas por regiões formadas por *loops* ou terminais altamente desestruturados podem levar ao aumento do valor do RMSD devido a alta flexibilidade mostrada por estas regiões, fazendo com que os átomos envolvidos no cálculo se distanciam um do outro quando alinhados (CARUGO *et al*., 2008; KUFAREVA *et al*., 2011; SARGSYAN *et al*., 2017).

O complexo scFv-CR3022-*Spike* foi criado por meio da transposição do antígeno presente no arquivo PDB ID 6ZDH para o modelo gerado, o qual representa a estrutura da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 com duas porções RBD em conformação ascendente, sendo essa estrutura obtida por meio de microscopia eletrônica (Figura 25a) (ZHOU *et al*., 2020). Para detalhar o reconhecimento do epítopo da proteína S pelo anticorpo scFv-CR3022, o complexo formado apenas com a porção RBD foi construído pela transposição desse antígeno presente no arquivo PDB ID 6W41 (Figura 25b).

Figura 25 - Anticorpo scFv-CR3022 interagindo com a proteína S (PDB ID 6ZDH).



(A) Anticorpo scFv-CR3022 (ciano) reconhecendo a RBD em conformação ascendente (branco). **(B)** Complexo scFv-CR3022-RBD construído a partir do antígeno disponível no arquivo PDB ID 6W41. **Fonte:** Este trabalho.

Como relatado previamente por Yuan *et al*., (2020), o epítopo reconhecido pelo anticorpo CR3022 apenas se torna acessível quando a RBD se apresenta em conformação ascendente, ou seja, quando a subunidade S1 expõe a proteína RBD para que esta interaja com o receptor celular. Porém, dados obtidos por microscopia crio-eletrônica (Crio-ME) mostram que mesmo quando uma RBD está exposta, a ligação do anticorpo à proteína antigênica pode ser estereoquimicamente impedida por outras presentes na proteína homotrimérica e que estão em conformação descendente (YUAN *et al*., 2020).

O modelo de anticorpo scFv-CR3022 obtido (Figura 25b) foi então utilizado nos cálculos de mutação sítio-dirigida para produzir uma nova estrutura otimizada com o objetivo de aumentar a interação desta com a proteína RBD do SARS-CoV-2 por meio de mutações promovidas nos resíduos de aminoácidos presentes no paratopo do anticorpo.

5.2 PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DO ANTICORPO scFv-CR3022 E CONSTRUÇÃO DE UM NOVO MODELO OTIMIZADO

5.2.1 Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presentes na interface do anticorpo scFv-CR3022 e caracterização da natureza de interação envolvida no reconhecimento frente ao antígeno

Os resultados do mapeamento dos resíduos de interface gerados pelos servidores PRODIGY (do inglês *protein binding energy*) e PISA (do inglês *protein interfaces, surfaces and assemblies*) apontaram 32 resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação do anticorpo com o antígeno, sendo classificados em 12 tipos diferentes de estruturas. Além disso, a análise da frequência relativa para cada resíduo demonstrou que a tirosina (TYR, total de 7 resíduos) e a serina (SER, total de 6 resíduos), são vistas como componentes majoritários, ocupando aproximadamente 40,6% do paratopo da proteína.

A metodologia adotada pelo PRODIGY se fundamenta nos estudos realizados por Kastritis *et al*. (2014), onde demonstraram as contribuições promovidas por superfícies não-interagentes da interface de contato entre duas proteínas e sua importância para a afinidade de ligação entre elas. Os pesquisadores perceberam que além do contato direto entre as interfaces, os resíduos de aminoácidos carregados ou polares, mesmo que não interagentes, contribuem de forma significativa para a afinidade entre as moléculas por meio de interações eletrostáticas de longo alcance, além daquelas formadas entre a superfície e o solvente mediadas por ligações de hidrogênio (KASTRITIS *et al*., 2011; KASTRITIS *et al*., 2014).

As análises realizadas pelo PRODIGY também utiliza de valores de variações de energia livre de Gibbs (ΔG) obtidas por métodos experimentais para estimar a presença de interação entre duas proteínas. Vangone e Bonvin (2015) avaliaram a correlação existente entre a distância de contato dos resíduos de aminoácidos de interface do complexo em um intervalo de 3.0 Å a 20 Å e os valores de ΔG para cada distância. Os resultados demonstraram que o maior número de contatos entre os resíduos responsáveis pela formação da rede de interação ocorria a 5.5 Å de distância, definindo deste modo, o *cut-off* de alcance do método (VANGONE; BONVIN, 2015; XUE *et al*., 2016).

Por outro lado, a abordagem utilizada pelo servidor PISA (do inglês *protein interfaces surfaces and assemblies*) leva em consideração que, em condições biológicas, um sistema formado por duas proteínas interagindo entre si é governado por propriedades físico-químicas de caráter diversos, como a energia de solvatação, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Essas interações são conservadas durante o processo de cristalização, onde as proteínas tendem a se organizar em uma rede ordenada para a formação do cristal. Desse modo, o servidor PISA faz uso desses parâmetros, entre outros listados pelo manual do programa, para analisar a estrutura da proteína em estudo e predizer possíveis resíduos de aminoácidos

presentes na interface de interação e que são responsáveis por manter a estabilidade do complexo (KRISSINEL; HENRICK, 2005; KRISSINEL; HENRICK, 2007).

A lista dos resíduos interfaciais estão descritos na tabela 3 de acordo com as propriedades físico-químicas apresentadas por cada estrutura.

Tabela 3 - Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presente na interface de interação do anticorpo scFv-C3022 realizado pelos servidores PRODIGY e PISA.

Grupos R alifáticos, apolares	Grupos R aromáticos	Grupos R polares, não carregados	Grupos R carregados positivamente	Grupos R carregados negativamente
G28*, G54*, G101*	F29*	S100, S103, S174*, S175*, S204*, S241*	K178*	D55, D107
I30, I102, I176	Y27, Y32*, Y52, Y173*, Y180, Y197, Y240	T31*, T104*, T201*	R59*	E57, E203
	W33, W198	N177*		

* Não foi encontrado interação direta entre o resíduo presente no anticorpo e o antígeno. **Fonte:** Este trabalho.

Uma análise detalhada pelo servidor PIC (do inglês *protein interactions calculator*) foi realizada com o objetivo de uma melhor compreensão da natureza de interação dos resíduos identificados pelos servidores e a distância dessas estruturas com o antígeno. Esse programa é utilizado para predizer possíveis interações formadas entre duas proteínas por meio de parâmetros obtidos de diversas literaturas disponíveis nos bancos de dados. Os critérios adotados pelo servidor estão detalhados no manual disponível no endereço eletrônico do programa (*http://pic.mbu.iisc.ernet.in/PIC_Criteria.pdf*) (TINA *et al*., 2007). Os resultados alcançados foram conferidos manualmente, de forma que os valores preditos pelos programas foram os mesmo observados medindo as distâncias interatômicas pela plataforma PyMOL. Ao todo, foram identificados cinco diferentes tipos de interações: ligações de hidrogênio, ligações iônicas, interações hidrofóbicas, interações cátion-π e empilhamento do tipo π-π. Não foram observadas interações formadas entre anéis aromáticos e grupamentos contendo o átomo de enxofre. Os valores obtidos para ligações de hidrogênio e ligações iônicas, assim como os principais átomos envolvidos nessas interações, estão detalhados na tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização do tipo de interação formada entre os resíduos de aminoácidos presentes na interface do complexo scFv-CR3022-RBD realizado pelo servidor PIC.

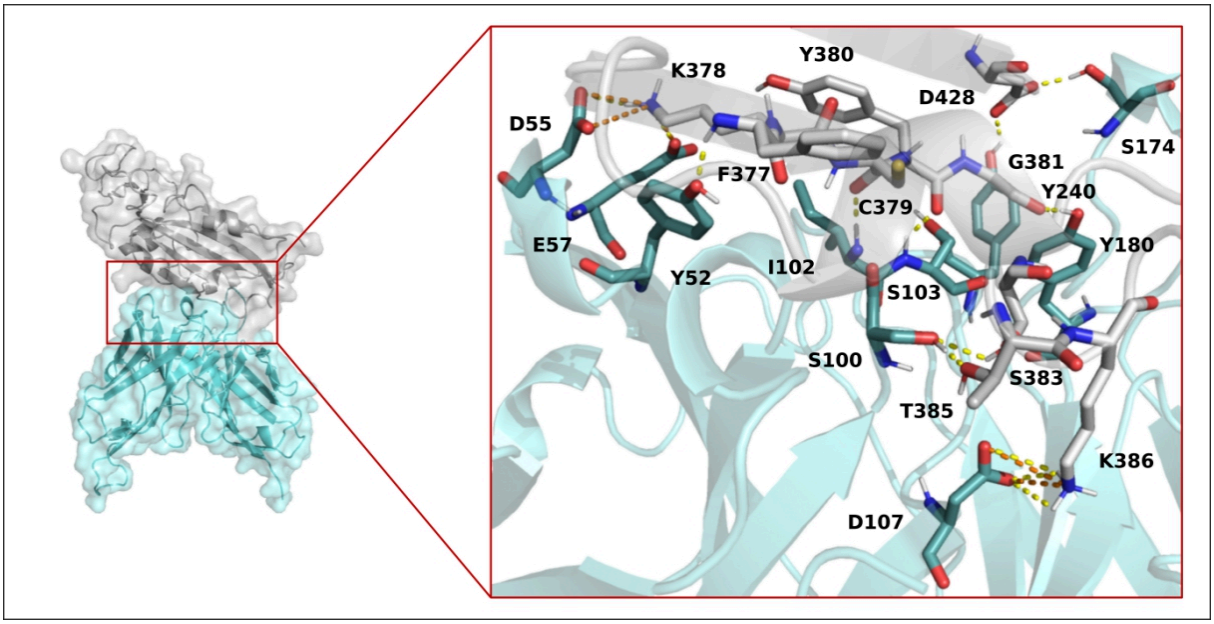
Ligação de Hidrogênio					
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022	SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
PHE 377 [H]	1.89	TYR 52 [OH]	LYS 386 [2HE]	2.70	ASP 107 [OD2]
PHE 377 [O]	2.50	TYR 52 [HH]	CYS 379 [O]	1.96	ILE 102 [H]
LYS 378 [2HE]	2.90	ASP 55 [OD1]	TYR 380 [O]	2.09	SER 103 [H]
LYS 378 [1HZ]	2.10	ASP 55 [OD2]	TYR 380 [O]	2.60	SER 103 [1HB]
LYS 378 [2HZ]	1.90	GLU 57 [OE1]	GLY 381 [O]	1.75	TYR 180 [HH]
THR 385 [OG1]	1.80	SER 100 [HG]	SER 383 [HG]	2.40	SER 100 [OG]
LYS 386 [1HZ]	2.90	ASP 107 [OD1]	ARG 408 [1HG]	2.90	ASP 55 [OD2]
LYS 386 [3HZ]	2.20	ASP 107 [OD1]	ASP 428 [OD1]	2.10	TYR 240 [HH]
LYS 386 [3HZ]	3.00	ASP 107 [OD2]	ASP 428 [OD2]	1.80	SER 174 [HG]
Ligação Iônica					
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022	SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
LYS 378 [NZ]	3.91	ASP 55 [OD1]	LYS 378 [NZ]	5.00	GLU 57 [OE2]
LYS 378 [NZ]	3.02	ASP 55 [OD2]	LYS 386 [NZ]	6.00	GLU 203 [OE1]
LYS 378 [NZ]	2.91	GLU 57 [OE1]	LYS 386 [NZ]	4.80	GLU 203 [OE2]
LYS 386 [NZ]	3.00	ASP 107 [OD1]	ARG 408 [NH1]	5.40	ASP 55 [OD2]
LYS 386 [NZ]	3.49	ASP 107 [OD2]			

Fonte: Este trabalho.

A existência de uma ligação de hidrogênio se baseia no conceito geométrico onde a estrutura doadora, o átomo de hidrogênio e a estrutura aceptora se encontram em uma ângulo maior que 120º, e a distância entre eles menores que 3.5 Å. Por outro lado, as ligações iônicas ocorrem entre quaisquer dois aminoácidos de cargas opostas, quando a cadeia lateral daqueles carregados positivamente (CZ, NE, NH1, NH2 para a ARG; CD2, CE1, CG, ND1, NE2 para

a HIS; NZ para a LYS) se encontram a uma distância inferior a 6 Å daqueles carregados negativamente (CG, OD1, OD2 para a ASP; CD, OE1, OE2 para a GLU) (VAN OSS; GOOD; CHAUDHURY, 1986; NGUYEN *et al*., 2017). Baseado nesses dados, a ocorrência dessas ligações foi vista como majoritária no complexo composto pelo anticorpo scFv-CR3022 e o antígeno RBD, de modo que essas interações são coordenadas, principalmente, por resíduos de LYS, ASP, GLU, TYR e SER, como mostram os resultados detalhados na tabela 4, obtidos pelos servidor PIC (Figura 26).

Figura 26 - Desenho esquemático da superfície de interação entre o anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD apresentando as principais interações iônicas e ligações de hidrogênio.

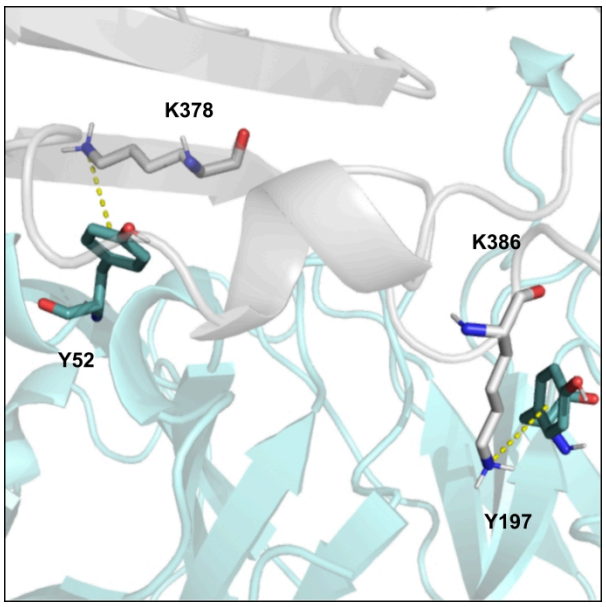


Em destaque as ligações de hidrogênio (linha tracejada amarela) e as ligações iônicas (linha tracejada alaranjada) formada entre os resíduos localizados na interface do complexo antígeno-anticorpo. **Fonte:** Este trabalho.

Com isso, corroborando com os estudos realizados por Jayashree *et al.* (2019), o programa foi capaz de prever que um único resíduo de aminoácido pode apresentar dois ou mais tipos de interações diferentes com o mesmo resíduo localizado na cadeia da proteína ligada ou, ainda, com resíduos adjacentes presentes nessa estrutura (JAYASHREE *et al*., 2019). Desse modo, observou-se que o resíduo de LYS378 do antígeno RBD é capaz de interagir tanto com a ASP55, quanto com a GLU57 do paratopo do anticorpo scFv-CR3022, por meio de ligações de hidrogênio e ligações iônicas formadas com ambos resíduos. O mesmo ocorre para a LYS386, onde o resíduo apresenta esses dois mecanismos de interações com a ASP107 durante o processo de reconhecimento pela superfície do anticorpo. Além

disso, interações cátion-π também foram identificadas em uma distância de 5.37 Å entre os resíduos de LYS378 e TYR52, e 5.35 Å para os resíduos de LYS386 e TYR197 (Figura 27) (APÊNDICE C.2).

Figura 27 - Ocorrência de interações cátion-π na interface do complexo anticorpo scFv-CR3022-RBD.



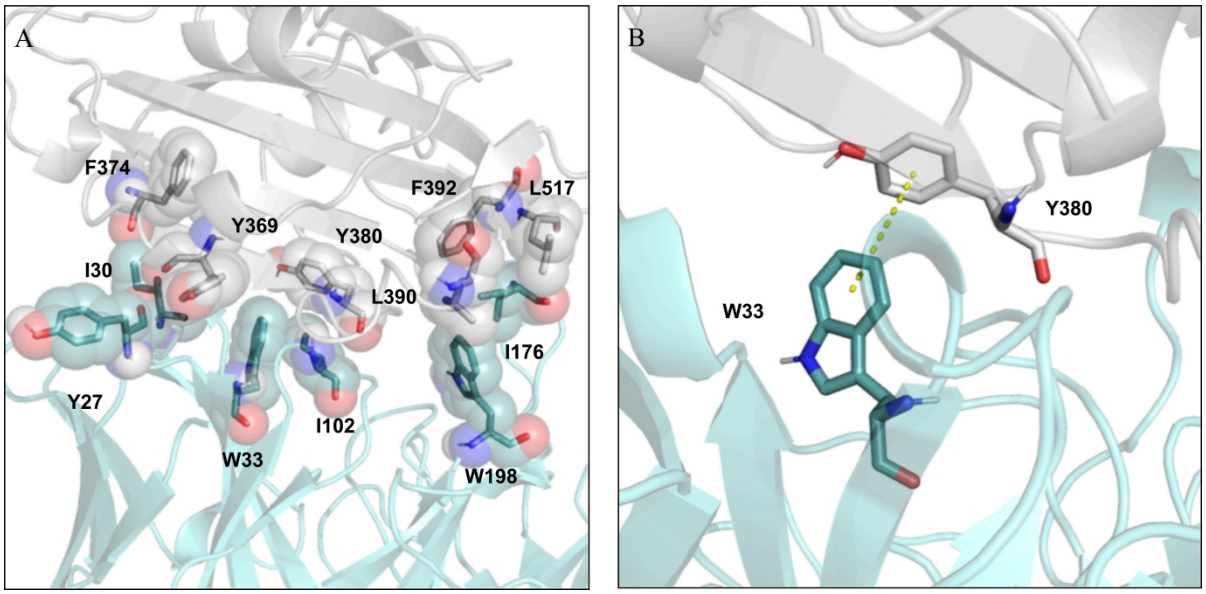
Interações cátion-π em até 6 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD do SARS-CoV-2. **Fonte:** Este trabalho.

Interações hidrofóbicas são caracterizadas como a capacidade de interação entre dois dos nove aminoácidos apolares (GLY, ALA, ILE, LEU, MET, PHE, PRO, VAL e TRP) a uma distância equivalente a 5.0 Å (NGUYEN *et al*., 2017). Essa forma de interação é importante para a estabilização do complexo proteína-proteína, de modo que durante o processo de ligação entre as moléculas, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos interfaciais tende-se a se agruparem em uma região mais internalizada da estrutura, processo o qual envolve um ganho de entropia, resultando na formação e estabilização do complexo (SUNDBERG *et al*., 2000; YAN *et al*., 2007).

Nas análises realizadas para o sistema anticorpo scFv-CR3022 e o antígeno RBD, foi observado que os principais resíduos de aminoácidos da interface entre as proteínas responsáveis por promover esse tipo de interação são majoritariamente resíduos de isoleucina (ILE, total de 5 resíduos), tirosina (TYR, total de 4 resíduos) e fenilalanina (PHE, total de 3 resíduos) (Figura 28a) (APÊNDICE C.1). No paratopo do anticorpo scFv-CR3022, os

resíduos de isoleucina (ILE, total de 5 resíduos) e tirosina (TYR, total de 1 resíduo) correspondem a 75% das estruturas responsáveis por esse tipo de interação, os outros 25% são ocupados por dois resíduos de triptofano (TRP, total de 2 resíduos). Em contrapartida, para a proteína RBD, além de dois resíduos de leucina (LEU, total de 2 resíduos), percebeu-se uma contribuição significativa demonstrada pelos resíduos de fenilalanina (PHE, total de 3 resíduos) e tirosina (TYR, total de 3 resíduos), juntas totalizando também 75% dos resíduos em interações hidrofóbicas do epítopo do antígeno. Apenas um empilhamento do tipo π-π foi observado a uma distância de 5.88 Å entre a cadeia lateral do TRP33 do anticorpo e o resíduo TYR380 da proteína RBD (Figura 28b) (APÊNDICE C.3).

Figura 28 - Interações de longo alcance identificadas na interface do complexo anticorpo scFv-CR3022-RBD.



(A) Presença de interações hidrofóbicas em até 5.0 Å de distância. **(B)** Ocorrência de empilhamento do tipo π-π a 5.88 Å de distância. **Fonte:** Este trabalho.

Para os resíduos assinalados com asterisco (*) na tabela 3, não foram encontrados formas de interações diretas entre o anticorpo scFv-CR3022 e o antígeno. Porém, dados obtidos pelo servidor PISA, mostram que essas estruturas apresentam área superficial exposta ao solvente, e, como observado por Kastritis *et al.* (2014), este tipo de contato auxilia na estabilidade do complexo antígeno-anticorpo (KASTRITIS *et al*., 2011; KASTRITIS *et al*., 2014). A tabela 5 lista os resíduos não interagentes presentes na interface do anticorpo scFv-CR3022 detalhando a área exposta e escondida para cada estrutura.

Tabela 5 - Resíduos não interagentes presentes no paratopo do anticorpo scFv-CR3022.

Resíduo de AA	ASA (Å^2)	BSA (Å^2)	Resíduo de AA	ASA (Å^2)	BSA (Å^2)
GLY 28	24.45	22.68	TYR 173	67.95	57.92
PHE 29	21.30	0.0	SER 174	103.87	24.49
THR 31	65.10	60.73	SER 175	102.16	54.12
TYR 32	25.44	10.72	ASN 177	107.46	17.97
GLY 54	29.37	8.38	LYS 178	71.62	18.71
ARG 59	113.38	15.71	THR 201	56.86	6.87
GLY 101	19.23	18.00	SER 204	109.72	3.43
THR 104	41.86	32.48	SER 241	25.67	0.0

ASA = *Accessible Surface Area* (Área de superfície acessível); BSA = *Buried Surface Area* (Área de superfície escondida). **Fonte:** Este trabalho.

Com o objetivo de aumentar as formas diretas de interação entre o anticorpo e o antígeno, os resíduos de aminoácidos não interagentes listados acima foram considerados prioritários nos cálculos de mutações sítio-dirigidas realizados pelo servidor MutateX (TIBERTI *et al*., 2019).

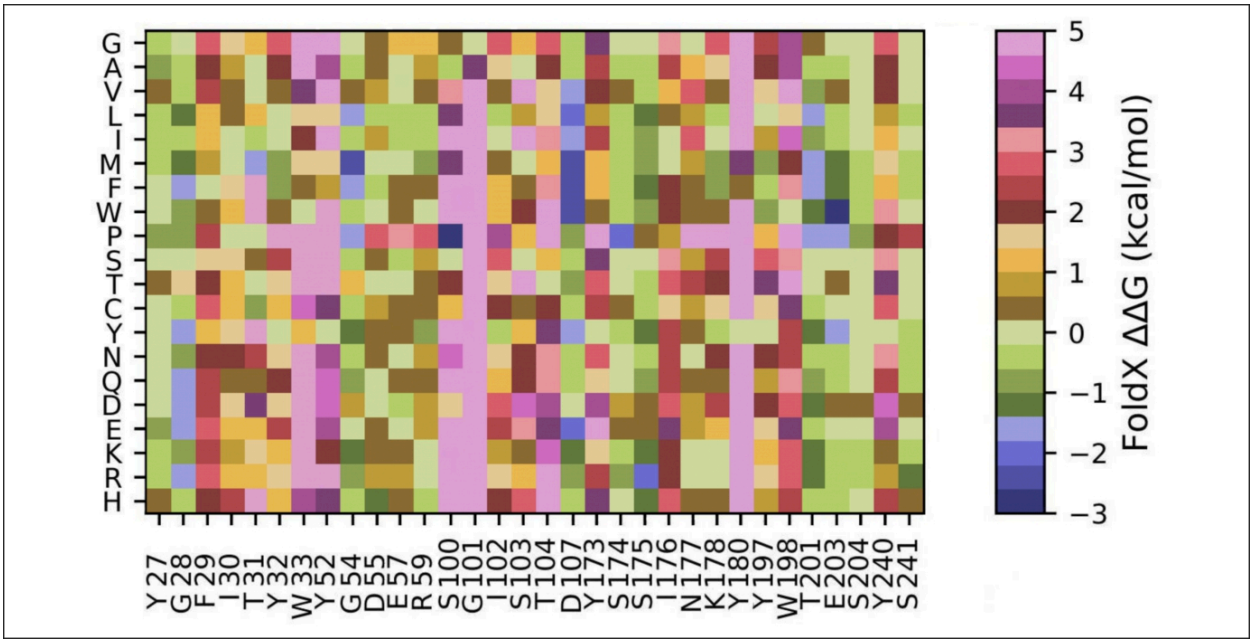
5.2.2 Cálculos de mutação sítio-dirigida

Os resultados da varredura mutacional está representado pela figura 29, obtida após os cálculos realizados de forma automatizada pelo servidor MutateX, sendo expresso em termos da ΔΔG atribuído a cada resíduo de aminoácido quando mutado para os outros 18 existentes.

A seleção dos melhores mutantes baseou-se no valor de $\Delta\Delta G \leq -1$ kcal.mol^{-1}, quando possível, além de analisar as contribuições físico-químicas apresentadas por cada resíduo de aminoácido presente nas regiões de reconhecimento molecular do anticorpo, levando em consideração os tipos de interações já formadas e tomando como prioridade aqueles que não apresentaram interações diretas com o antígeno, como descrito anteriormente. A escolha do resíduo mutante também considerou a posição onde o resíduo de aminoácido estava inserido,

de forma que uma mudança radical, como a troca de uma ASP107 por uma MET, poderia levar a uma perturbação não favorável da estrutura de reconhecimento molecular, mesmo que esse resíduo apresentou o melhor valor de ΔΔG. Isso pode ocorrer pois o servidor não analisa o efeito da mutação na estrutura como um todo, mas sim as consequências causadas em um único ponto. A lista dos resíduos de aminoácidos escolhidos para serem otimizados pode ser consultada no APÊNDICE D.

Figura 29 - Mapa de calor obtido pelos cálculos realizados pelo MutateX.



Mapa de calor representando as consequências ocorridas nos resíduos de aminoácidos após os cálculos de mutação, sendo expresso pelo valor de ΔΔG atribuído. **Fonte:** Este trabalho.

5.2.3 Desenho e construção de um novo modelo de anticorpo scFv otimizado

Após a inserção dos novos resíduos de aminoácidos na sequência primária do anticorpo scFv-CR3022, os quais foram selecionados pelo método de varredura mutacional no paratopo da molécula, a construção do modelo da proteína prosseguiu-se pela mesma metodologia detalhada pela figura 21. O anticorpo scFv otimizado foi nomeado como MAD22 e os resultados do processo de validação da estrutura estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Processos de validação da estrutura do anticorpo em formato scFv MAD22.

Ramachandran Plot				ProSA-web Z-score	ERRAT Overall quality factor (%)	Verify3D % dos resíduos com pontuação 3D-1D ≥ 0,2
Resíduos nas regiões mais favorecidas (%)	Resíduos em regiões adicionais permitidas (%)	Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	Resíduos em regiões não permitidas (%)			
90,2%	9,8%	0,0%	0,0%	-6,66	78,39	98,83%

Os servidores utilizados avaliaram a qualidade energética do modelo (ProSA-web), estereoquímica (PROCHECK), relação estrutura 3D-1D (VERIFY3D) e interações atômicas incorretas (ERRAT). **Fonte:** Este trabalho.

Como observado, os valores de qualidade obtidos para o modelo do anticorpo scFv MAD22 foram semelhantes aqueles alcançados pelo anticorpo scFv-CR3022 utilizando os mesmo parâmetros de avaliação, indicando que as modificações dos resíduos de aminoácidos na interface de reconhecimento molecular não causaram pertubação estrutural da proteína.

As análises referentes a qualidade energética do modelo realizado pelo servidor ProSA-web, demonstraram que a estrutura modelada se encontra em regiões típicas de proteínas elucidadas pelo método de RMN, caracterizado por valores de Z-score igual a -6,66 (Tabela 6). Além disso, a maioria dos resíduos de aminoácidos do anticorpo scFv MAD22 se encontram em regiões de baixa energia, como previsto para proteínas bem estruturadas (APÊNDICE B.2) (WIEDERSTEIN *et al*., 2007).

A estereoquímica da molécula assemelhou-se em qualidade com aquela apresentada pelo anticorpo scFv-CR3022 (Tabela 6). O gráfico de Ramachandran plotado por meio do servidor PROCHECK obteve 90,2% dos resíduos de aminoácidos em ambiente químicamente favorável na estrutura da proteína, totalizando 185 resíduos. Em regiões permitidas estereoquimicamente, esse valor correspondeu a 20 resíduos, representando 9,8% dos componentes do anticorpo scFv MAD22. Assim como demonstrado nas análises do anticorpo scFv-CR3022, não foram encontrado resíduos em regiões pouco favoráveis ou em regiões não permitidas (LASKOWSKI *et al*., 1993; HOLLINGSWORTH *et al*., 2010). A estrutura do anticorpo scFv MAD22 apresenta dois resíduos de glicina a menos do que o observado para o

anticorpo scFv-CR3022, sendo substituídos por resíduos de glutamato e glutamina, de acordo com os cálculos de mutação sítio-dirigida. Por outro lado, houve uma substituição de um resíduo de serina por uma prolina, de modo que a presença dessa totaliza 12 resíduos na nova estrutura de anticorpo (APÊNDICE B.4).

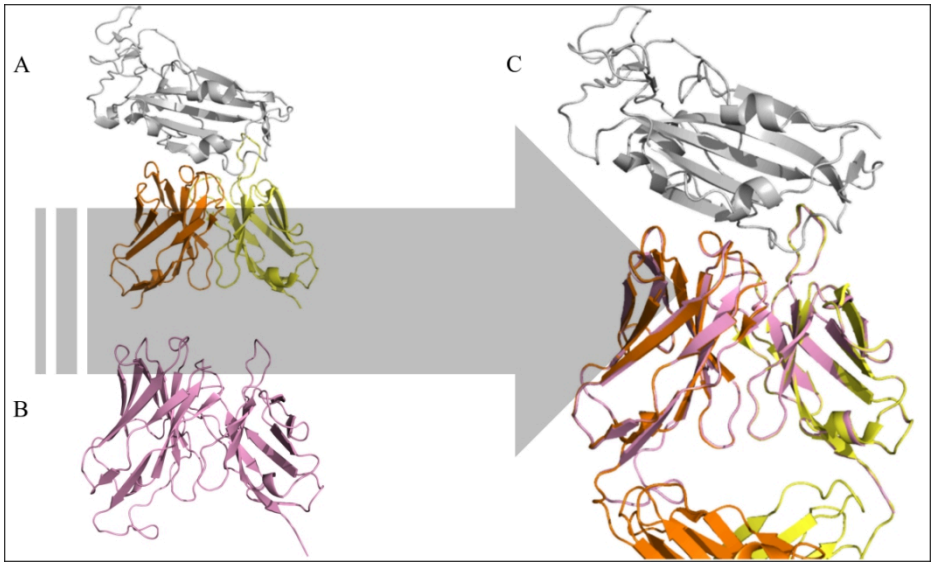
Como demonstrado, dos 38 resíduos de glicina, apenas um não se encontra em regiões favoráveis, sendo esse localizado na posição 141 da cadeia da proteína. Análise da presença desse resíduo na estrutura do anticorpo scFv MAD22, percebe-se que esse está situado na porção terminal da alça flexível, o qual une ambos domínios da proteína. Desse modo, a flexibilidade apresentada pela estrutura leva a uma variação da localização do resíduo de glicina onde, podendo transitar entre regiões favoráveis e não favoráveis. Em contrapartida, todos os resíduos de prolina se encontram em ambientes estereoquimicamente favoráveis.

Em seguida, o modelo de anticorpo scFv MAD22 foi submetido ao servidor Verify3D para avaliar a relação entre sua estrutura tridimensional (3D) e sua sequência primária (1D) (EISENBERG *et al*., 1997). O valor obtido pelo programa demonstrou que 98,83% dos resíduos se encontram dentro dessa relação, correspondendo a valores ≥ 0,2 representado pelo eixo y no gráfico, indicando uma boa qualidade do modelo gerado. Entretanto, uma pequena parcela de resíduos se encontram em regiões ≥ 0,1, podendo indicar a presença de região instável do modelo. Os resultados da análise podem ser observados na tabela 6 e também consultado no APÊNDICE B.6.

Curiosamente, os cálculos realizados pelo servidor ERRAT com o objetivo de analisar as interações entre átomos não ligados da proteína, demonstrou valores melhores do que os observados para o anticorpo scFv-CR3022, sugerindo que 78,39% dos resíduos de aminoácidos estão abaixo do limite de rejeição padronizado pelo programa, assegurando a qualidade do modelo (Tabela 6). O gráfico gerado pode ser visualizado no APÊNDICE B.8.

Ao término do processo de validação do modelo, foi realizado o cálculo da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) pela mesma metodologia descrita anteriormente. A similaridade encontrada entre o modelo de anticorpo scFv MAD22 e o molde PDB ID 6W41 foi equivalente a 0.093 Å de distância entre as proteínas, sendo esse valor melhor do que o alcançado pelo anticorpo scFv-CR3022, demonstrando precisão no dobramento adotado pela proteína (Figura 30).

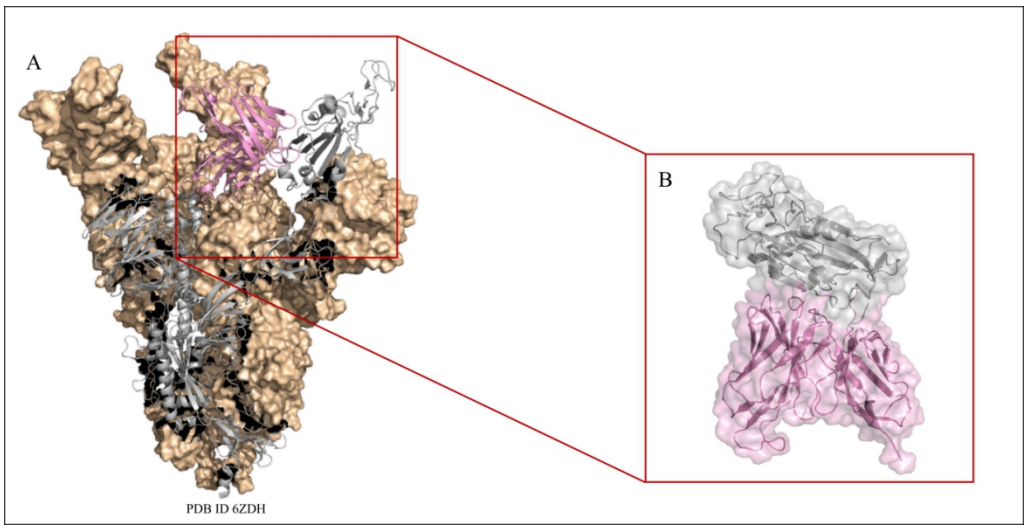
Figura 30 - Alinhamento estrutural obtido pelo cálculo do RMSD entre o cristal e o modelo scFv MAD22.



(A) Porção Fv do cristal PDB ID 6W41. **(B)** Modelo de anticorpo scFv MAD22. **(C)** O alinhamento estrutural entre a porção Fab do cristal PDB ID 6W41 e o modelo de anticorpo scFv MAD22 demonstrou valor de RMSD = 0.093 Å, indicando alto grau de similaridade entre as proteínas. **Fonte:** Este trabalho.

O complexo anticorpo scFv MAD22-*Spike* também foi construído por meio da transposição da proteína antigênica disponível no arquivo PDB ID 6ZDH, e o detalhamento do reconhecimento da proteína RBD foi alcançada pela mesma metodologia utilizando a estrutura presente no arquivo PDB ID 6W41 (Figura 31).

Figura 31 - Anticorpo scFv MAD22 interagindo com a proteína S (PDB ID 6ZDH).

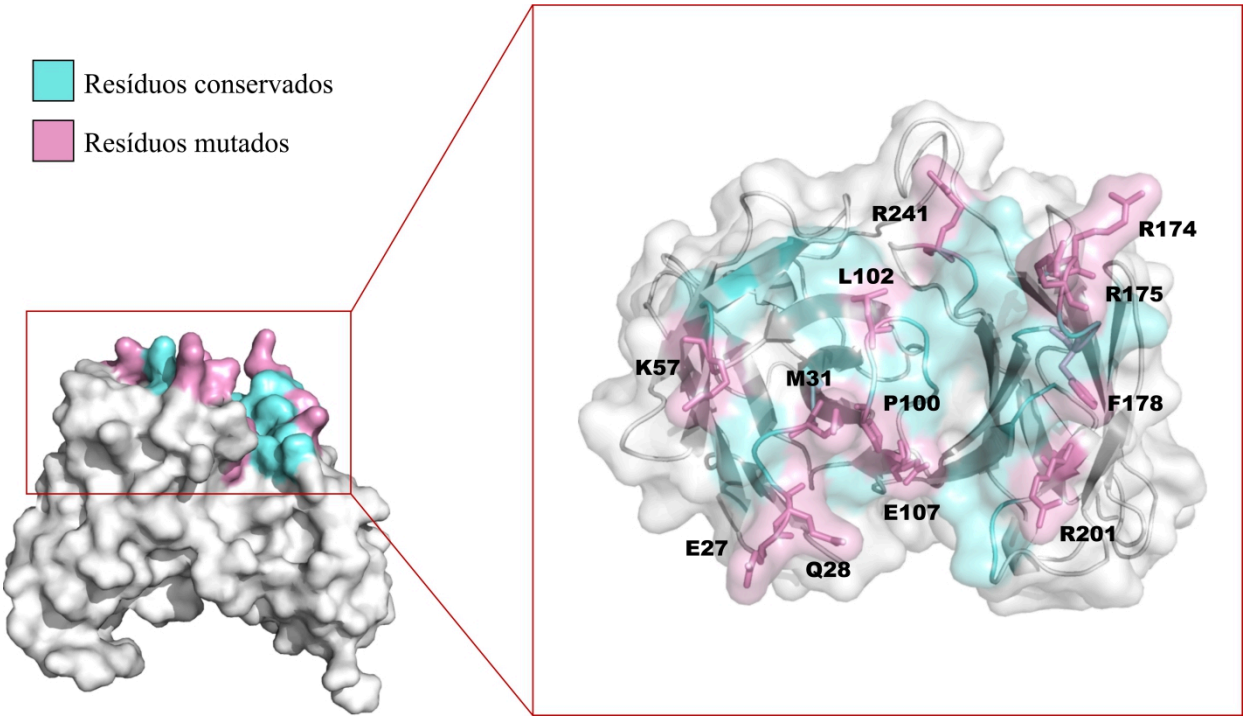


(A) Anticorpo scFv MAD22 (rosa) reconhecendo a RBD em conformação ascendente (branco). **(B)** Complexo scFv MAD22-RBD construído a partir do antígeno disponível no arquivo PDB ID 6W41. **Fonte:** Este trabalho.

5.2.4 Análise do paratopo do anticorpo scFv MAD22 para a estimativa do ganho de interação entre o anticorpo e o antígeno

O anticorpo scFv MAD22 foi submetido às mesmas análises descritas para a proteína não otimizada. Os servidores identificaram 33 resíduos de aminoácidos presentes no paratopo do anticorpo e que são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, sendo observado o ganho de um resíduo de prolina na posição 105. Além disso, todos os resíduos adicionados após os cálculos de mutação foram preditos como interfaciais, indicando que as mudanças não levaram a uma perturbação conformacional do paratopo da molécula (Figura 32).

Figura 32 - Vista superior do paratopo do anticorpo scFv MAD22.



Paratopo do anticorpo scFv MAD22 destacando os resíduos de aminoácidos mutados após os cálculo efetuados pelo servidor MutateX, representado por estruturas em *sticks* na imagem acima. Para aqueles que permaneceram conservado na molécula apenas sua forma em *cartoon* foi considerada (resíduos em ciano). **Fonte:** Este trabalho.

Os 33 resíduos de aminoácidos preditos podem ser distribuídos em 16 tipos diferentes de estruturas, mais do que o observado para o anticorpo scFv-CR3022, onde essa diversidade era composta por apenas 12 tipos diferentes de resíduos. Os resíduos de tirosina (TYR, total de 6 resíduos) continuam sendo os mais frequentes na interface da molécula, em adição com os resíduos de arginina (ARG, total de 6 resíduos) adquiridos pelo processo de mutação sítio-

dirigida, onde na estrutura original era observado apenas uma unidade. Ao todo, os resíduos de tirosina e arginina somam 36,36% do paratopo do anticorpo scFv MAD22. A tabela 7 detalha a posição e as características físico-químicas de cada resíduo.

Tabela 7 - Mapeamento dos resíduos de aminoácidos presente na interface de interação do anticorpo scFv MAD22 realizado pelos servidores PRODIGY e PISA, tendo em destaque (sublinhado) aqueles que foram mutados.

Grupos R alifáticos, apolares	Grupos R aromáticos	Grupos R polares, não carregados	Grupos R carregados positivamente	Grupos R carregados negativamente
G101*	F178	S103, S204*	K54*	D55
I30, I176	Y32*, Y52, Y173*, Y180, Y197, Y240*	T104*	R59*, R174, R175, R201, R202*, R241	E27*, E57, E107, E203
I102	W33, W198	N177*	Q28	
P100, P105*		N31		

* Não foi encontrado interação direta entre o resíduo presente no anticorpo e o antígeno. **Fonte:** Este trabalho.

A caracterização das ligações moleculares formadas entre o antígeno e o anticorpo demonstrou a presença de todas as seis interações preditas pelo servidor PIC, o que não foi observado para o anticorpo scFv-CR3022. O ganho de interação ocorreu, principalmente, devido a presença de resíduos de arginina mutados nas posições 174, 175, 201 e 241, participando tanto de ligações de hidrogênio quanto de ligações iônicas. Além disso, as modificações no paratopo da proteína foi responsável por otimizar resíduos de aminoácidos, os quais já estavam presentes na estrutura nativa, indicando que as mutações realizadas favoreceram o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo MAD22.

A tabela 8 traz de forma comparada os ganhos (+) e as perdas (-) de interações observadas para ambos os anticorpos. Para maiores detalhes, consultar o APÊNDICE C.

Enquanto houve o acréscimo de uma PRO105 na interface do anticorpo scFv MAD22, o servidor não identificou a presença do resíduo de PHE29 a qual havia na superfície do anticorpo scFv-CR3022, sugerindo que as mutações dos resíduos vizinhos influenciam sobre a localização desses resíduos na estrutura. Além disso, o programa demonstrou q a mudança de um resíduo de aminoácido com características físico-químicas semelhantes pode ser

favorável ou não no que tange a interação com o antígeno, como o observado para o resíduo de THR31 mutado para o resíduo de MET, onde houve o ganho de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interação do tipo aromático-enxofre, em contrapartida, a mutação do resíduo de ASP107 por uma GLU resultou na perda de uma ligação de hidrogênio entre o anticorpo e o antígeno.

A porcentagem de resíduos não interagentes de forma direta também foi afetada pelas modificações na superfície do anticorpo. Enquanto esses valores correspondiam a 50,0% do paratopo do anticorpo scFv-CR3022, as análises demonstraram que apenas 36,36% dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície do anticorpo scFv MAD22 não foram capazes de interagir com o antígeno.

É interessante ressaltar que as análises apresentadas pelo PIC apenas nos dão uma estimativa das possíveis interações formadas pelo complexo antígeno-anticorpo, sendo necessário simulações de dinâmica molecular com o objetivo de demonstrar, em termos de energia livre de ligação (ΔG), as consequências ocasionadas pelos cálculos de mutação sítio-dirigidas.

Tabela 8 - Análise comparativa das interações formadas entre os anticorpos scFv e o antígeno RBD para o estudo das consequências ocasionadas pelos cálculos de mutação.

scFv-CR3022	Posição	scFv MAD22	Perda/ ganho interação	scFv-CR3022	Posição	scFv MAD22	Perda/ ganho interação
TYR	27	GLU	- Interação hidrofóbica	-	105	PRO	Não foi observado
GLY	28	GLN	+ Ligação de hidrogênio	ASP	107	GLU	- Ligação de hidrogênio
PHE	29	-	Não foi observado	TYR	173	TYR	Não houve alteração
ILE	30	ILE	+ Interação hidrofóbica	SER	174	ARG	+ Ligação iônica
THR	31	MET	+ Ligação de hidrogênio/ Interação hidrofóbica/ Ar-S	SER	175	ARG	+ Ligação de hidrogênio/ iônica
TYR	32	TYR	Não houve alteração	ILE	176	ILE	+ Interação hidrofóbica
TRP	33	TRP	+ Interação cátion-π	ASN	177	ASN	Não houve alteração
TYR	52	TYR	+ Interação hidrofóbica	LYS	178	PHE	+ Interação hidrofóbica
GLY	54	LYS	Não houve alteração	TYR	180	TYR	+ Ligação de hidrogênio
ASP	55	ASP	+ Ligação iônica	TYR	197	TYR	Não houve alteração
GLU	57	GLU	+ Ligação de hidrogênio	TRP	198	TRP	Não houve alteração
ARG	59	ARG	Não houve alteração	THR	201	ARG	+ Ligação de hidrogênio/ iônica
SER	100	PRO	- Ligação de hidrogênio / + Interação hidrofóbica	GLU	203	GLU	+ Ligação de hidrogênio
GLY	101	GLY	Não houve alteração	SER	204	SER	Não houve alteração
ILE	102	LEU	+ Ligação de hidrogênio	TYR	240	TYR	- Ligação de hidrogênio
SER	103	SER	Não houve alteração	SER	241	ARG	+ Ligação de hidrogênio/ iônica
THR	104	THR	Não houve alteração				

Fonte: Este trabalho.

5.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR: MÉTODOS AMPLIADOS NO ESTUDO DO COMPORTAMENTO DOS ANTICORPOS scFv-CR3022 e scFv MAD22 FRENTE AO ANTÍGENO RBD PERTENCENTE AO VÍRUS SARS-CoV-2

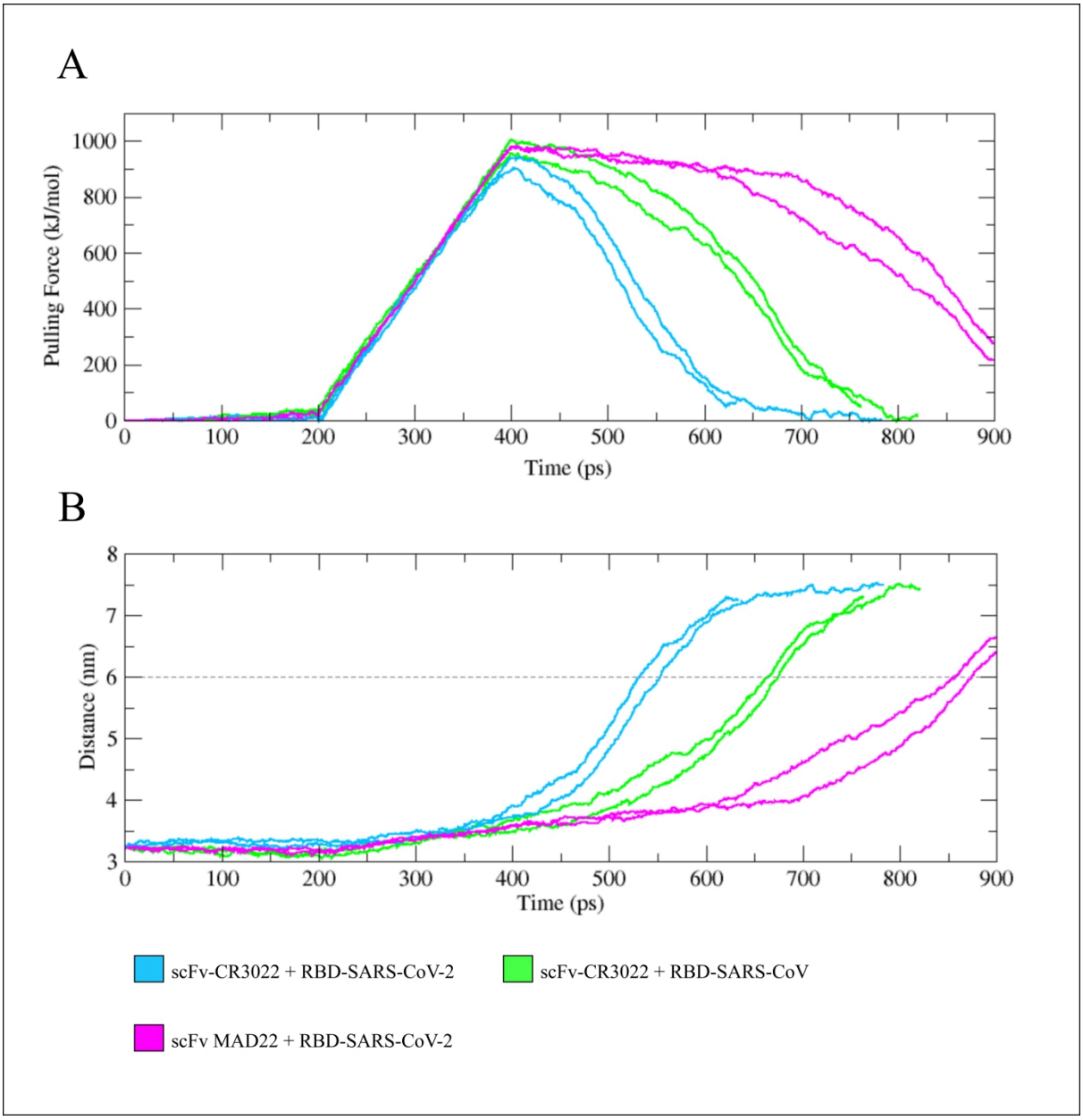
A análise da força de interação entre o complexo formado pelo anticorpo scFv-CR3022/ scFv MAD22 e a proteína RBD foi realizada por meio de simulação de dinâmica molecular direcionada, onde uma força de 1000 kJ/mol foi aplicada a cada complexo em um intervalo de tempo de 900 ps para promover a dissociação entre as proteínas (Figura 33a). O limiar entre o estado ligado e desligado do complexo ocorre a uma distância de 6 nm, representada na figura 33b por uma linha tracejada na horizontal, sendo este referente a distância existente entre o centro de massa de cada proteína.

As análises das interações realizadas para o anticorpo scFv-CR3022 com a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 (linha ciano) revelaram que estas ocorrem de forma mais fraca quando comparada com os outros dois complexo. A dissociação do complexo inicia-se após 400 ps de simulação, sendo completamente desligado após aproximadamente 550 ps, como observado pela figura 33b. A interação fraca formada pelo complexo anticorpo scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV-2 era esperado, uma vez que a construção desse anticorpo scFv é referente a porção Fv do cristal PDB ID 6W41, o qual foi obtido a partir de um anticorpo anti-RBD do vírus SARS-CoV isolado de pacientes portadores da SARS. Em contrapartida, quando anticorpo scFv-CR3022 interage com o antígeno RBD do SARS-CoV (linha verde) o tempo em que o complexo leva para se dissociar se prolonga. Após 500 ps de simulação o anticorpo permanece interagindo com a RBD, ocorrendo a separação completa entre as proteínas apenas após 650 ps, sugerindo que o desligamento do complexo requer um maior acúmulo de energia. Entretanto, quando as análises foram realizadas para o anticorpo scFv MAD22 o perfil de interação diferiu significativamente (linha magenta). O anticorpo mutado permaneceu fortemente associado ao antígeno RBD referente ao SARS-CoV-2 durante aproximadamente 700 ps de simulação, ocorrendo a completa dissociação do complexo após 850 ps de simulação.

As configurações obtidas durante as simulações de dinâmica molecular direcionada para os complexos de antígeno-anticorpo foram utilizadas nos cálculos do potencial de força média (PMF, do inglês *potential of mean force*) realizados pelo método de *Umbrella sampling*. O potencial de força média corresponde a energia livre associada ao desligamento do complexo antígeno-anticorpo em função da coordenada de reação (ξ). O cálculo foi realizado

simulando 16 janelas espaçadas a uma distância de 1 nm entre elas nas configuração de 3.5 - 7.0 nm, levando a um tempo total de simulação de 6,4 μs.

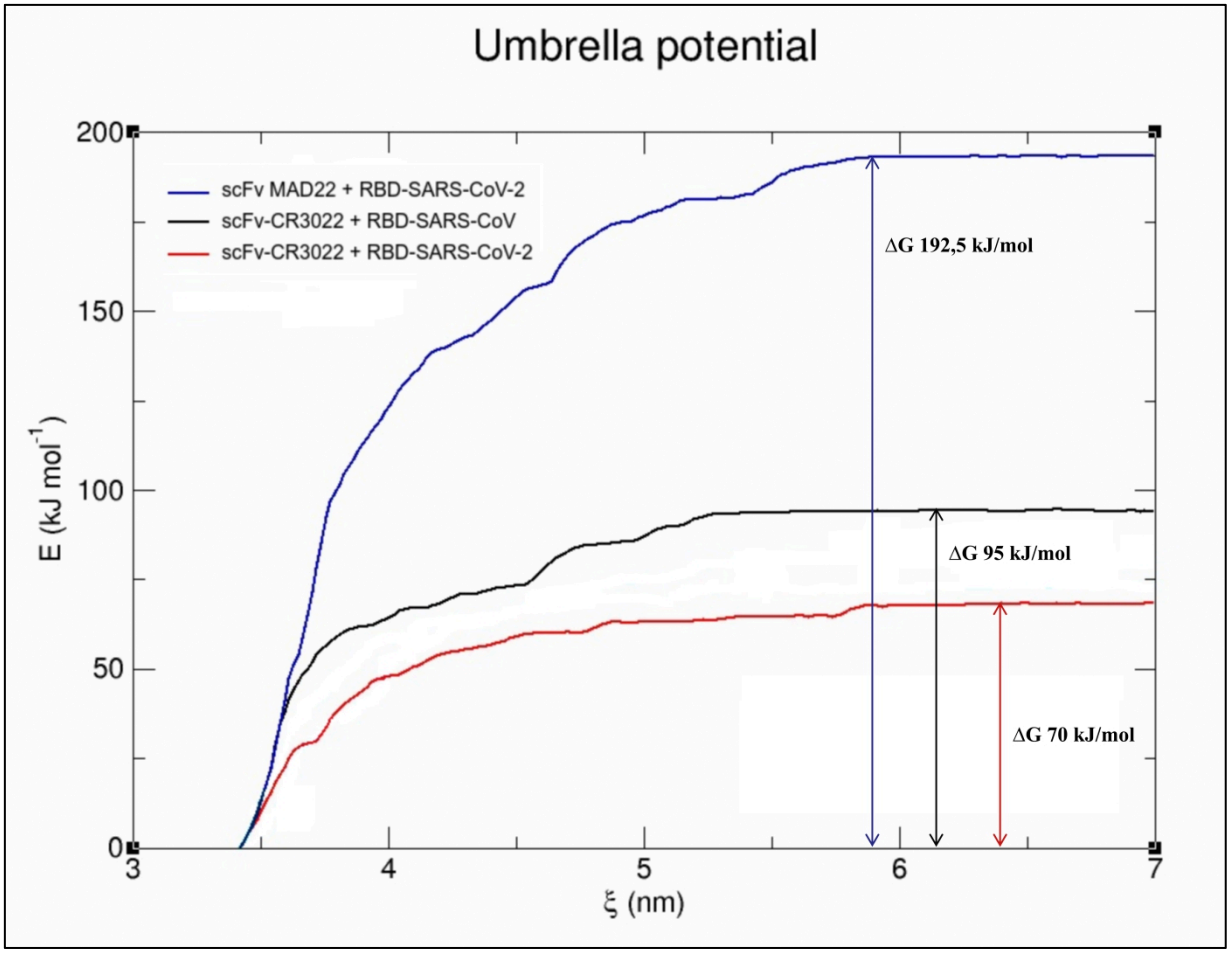
Figura 33 - Simulação de dinâmica molecular direcionada realizada para os complexos scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV-2, scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV e scFv MAD22-RBD-SARS-CoV-2.



(A) Gráfico representando a força aplicada no sistema em KJ/mol (*y*) versus o tempo de simulação necessário para a dissociação dos complexos em picossegundo (*x*). **(B)** Gráfico representando a distância entre os centros de massas para cada proteína dada em nanometros (y) versus o tempo de simulação necessário para a dissociação dos complexos em picossegundo (*x*). **Fonte:** Este trabalho.

De acordo com a figura 34, pode-se observar que a energia livre correspondente a dissociação entre o complexo anticorpo scFv MAD22 e a RBD do SARS-CoV-2 (linha azul escuro) está em torno de 192,5 kJ/mol enquanto que para o complexo formado entre o anticorpo scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV-2 (linha vermelha) esses valores não ultrapassam a 70 kJ/mol. Esse resultado indica que as mutações realizadas no paratopo do anticorpo aumentaram a energia de ligação existente entre o complexo antígeno-anticorpo, podendo sugerir o aumento de afinidade entre eles. Quando a simulação foi realizada para complexo scFv-CR3022-RBD-SARS-CoV (linha preta) os resultados se mostraram totalmente corroborativos com o que fora observado até então, indicando um aumento de energia livre, em torno de 95 kJ/mol, o que era esperado para o anticorpo neutralizante.

Figura 34 - Gráfico do potencial de forma média obtido pelo método de *Umbrella sampling*.



Energia livre (kJ/mol) associada ao processo de desligamento dos complexos antígeno-anticorpo em função da coordenada de reação (ξ) obtido pelo método de *Umbrella sampling*. **Fonte:** Este trabalho.

Com o objetivo de validar as estruturas construídas pelos métodos de biofísica computacional, o próximo capítulo retrata a metodologia adotada e os resultados obtidos durante a expressão e purificação dos anticorpos scFv recombinantes.

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv EM *Escherichia coli* PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DIRETO DA COVID-19

"A esperança equilibrista sabe que o show de todo artista tem que continuar."
Elis Regina

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa causada pelo novo coronavirus SARS-CoV-2 e declarada pandêmica no dia 11 de março de 2020 (HU et al., 2020). O processo infeccioso inicia-se por meio da interação entre domínio de ligação ao receptor localizado em uma subunidade da proteína *Spike* expressa na membrana do vírus, com receptores ECA2 encontrados principalmente em células pulmonares, podendo desencadear sintomas leves no hospedeiro ou culminar em respostas moderadas a graves, resultando na morte do doente (ORTIZ-PRADO *et al*., 2020; V'KOVSKI *et al*., 2020)

Limitações apresentada pelo método da PCR, padrão ouro no diagnóstico da doença, torna-se difícil promover a ampla testagem da população (SCOHY *et al*., 2020). Além disso, métodos de triagem como os testes baseados na sorologia do paciente são desvantajosos no que tange o rastreio precoce dos doentes, devido a necessidade da produção de anticorpos IgM e IgG, os quais ocorrem de forma tardia (D'CRUZ *et al*., 2020; VABRET *et al*., 2020). Desse modo, a necessidade de métodos de detecção capazes de capturar o antígeno em amostras de pacientes tornam-se de suma importância para auxiliar e coordenar no controle da doença (MERTENS *et al*., 2020).

A tecnologia do DNA recombinante levou ao estudo de diferentes sistemas utilizados na produção de proteínas pelo método de expressão heterologa, permitindo o aumento de produção de bioprodutos de interesse industrial como enzimas, hormônios e anticorpos, de forma rápida e barata, impulsionando o desenvolvimento de fármacos e insumos aplicados ao diagnósticos de doenças infecciosas (GOMES *et al*., 2016). Neste trabalho, o organismo de empressão *E. coli* foi utilizado para produzir anticorpos anti-SARS-CoV-2 para aplicação no desenvolvimento de um novo teste diagnóstico baseado na captura do antígeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

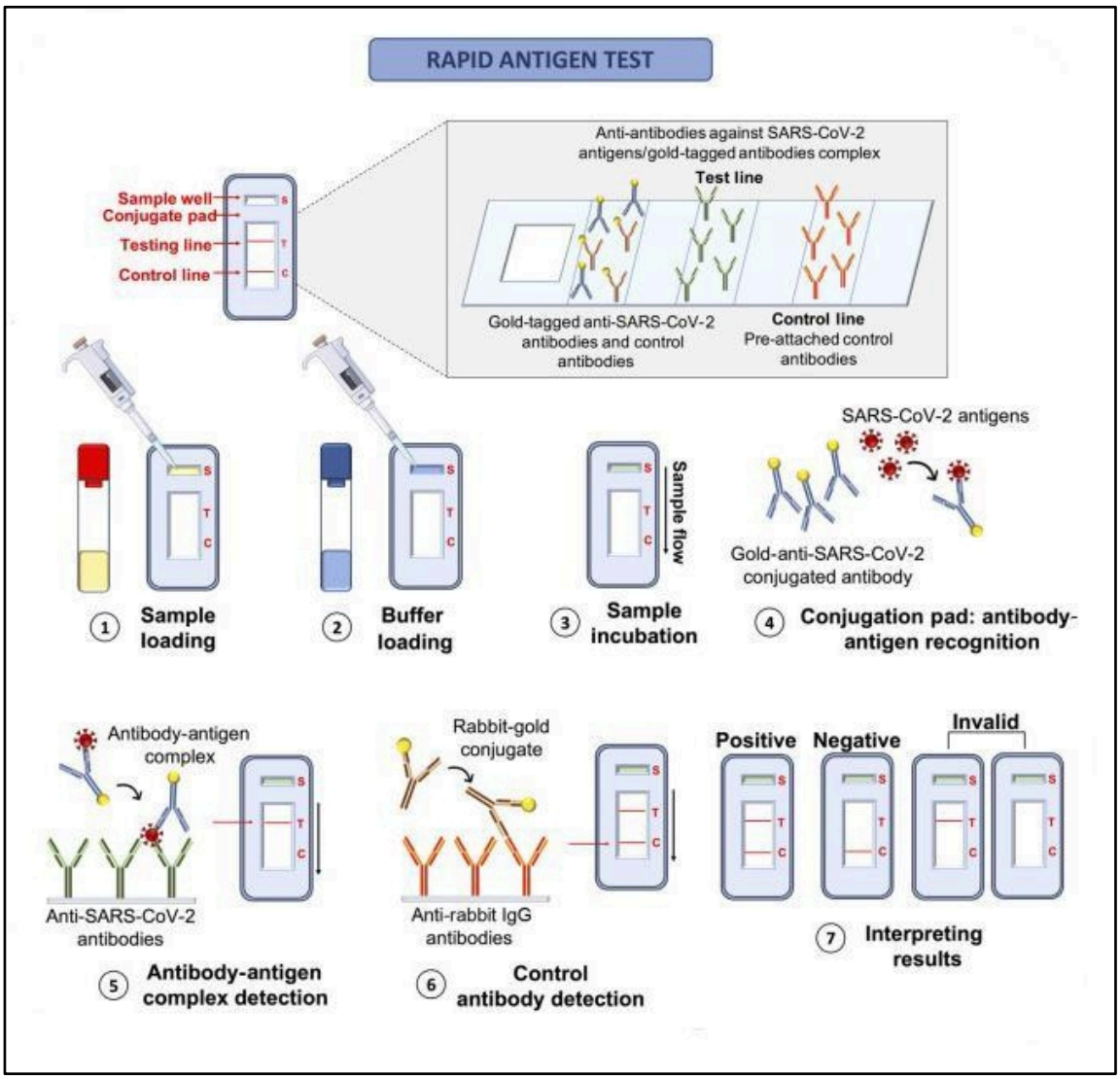
2.1 TESTE DE CAPTURA DE ANTÍGENO NA DETECÇÃO DA COVID-19

Como retratado anteriormente, a técnica da PCR é considerada o padrão ouro no diagnóstico da COVID-19. Entretanto, as limitações apresentadas pelo método formam obstáculos no que tange a ampla testagem da população (SCOHY *et al*., 2020). Além disso, os recursos necessários para a realização do método não estão disponíveis em postos de saúde locais, sendo esse espaço o primeiro a ser procurado por pacientes suspeitos de portar a COVID-19 (YAMAYOSHI *et al*., 2020). Nessa vertente, métodos baseados na detecção de anticorpos contra o vírus foram desenvolvidos e implementados com o objetivo de ampliar o acesso ao diagnóstico da doença. Porém, a falta de acurácia e a necessidade da soroconversão do paciente, a qual pode ocorrer em até 18 dias após infecção, dificultam o rastreio precoce dos indivíduos infectados (D'CRUZ *et al*., 2020; DIAO *et al*., 2021).

De modo a contornar essa problemática, testes rápidos baseados na captura do antígeno foram produzidos e aprovados para uso clínico em diversos países, auxiliando nas tomadas de decisões frente a pacientes suspeitos de apresentar a infecção (MERTENS *et al*., 2020; YAMAYOSHI *et al*., 2020). O tempo de execução do método geralmente leva de 15 a 30 minutos, não requerendo mão de obra altamente qualificada, além de ser mais barato do que a técnica da PCR. Semelhante aos testes rápidos sorológicos, os testes baseados na captura do antígeno também se fundamentam no princípio do imunoensaio de fluxo lateral, porém, o alvo desse método são as duas principais proteínas antigênicas presentes na estrutura do SARS-CoV-2 (proteína S e proteína N). As amostras utilizadas podem ser coletadas por meio do swab no trato respiratório superior ou até mesmo amostras de saliva dos pacientes suspeitos (FALZONE *et al*., 2021; KEVADIYA *et al*., 2021). A figura 35 mostra de forma esquematizada como ocorre esse método de detecção do vírus causador da COVID-19. Resumidamente, a amostra do paciente suspeito é depositada no cassete contendo uma membrana de nitrocelulose imobilizada com o agente de captura e, em seguida, adiciona-se o tampão salino fazendo com que a amostra flua por capilaridade pela superfície da membrana durante o período de incubação. Ao longo desse processo, anticorpos conjugados a ouro se ligam aos antígenos específicos, sendo, em seguida, complexados com os agentes de captura, resultando no surgimento de uma banda indicando que o teste positivou para o vírus SARS-CoV-2. Uma outra banda surge para assegurar a eficácia do teste, sendo essa a linha

denominada controle, composta pelo complexo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado ao ouro e seu respectivo antígeno (FALZONE *et al*., 2021; PETO *et al*., 2021).

Figura 35 - Método esquemático da detecção da COVID-19 pelo método de captura de antígeno resumido em 7 principais etapas.



(1) Adição da amostra no cassete. **(2)** Adição do tampão salino. **(3)** Incubação da amostra. **(4)** Formação do complexo antígeno-anticorpo conjugado ao ouro. **(5)** Detecção do complexo pelo agente de captura. **(6)** Formação do complexo controle. **(7)** Interpretação dos resultados. **Fonte:** Adaptado de FALZONE *et al*. (2021).

Um estudo realizado por Cassuto *et al*. (2021) objetivou avaliar a eficácia de detecção de pacientes portadores do vírus SARS-CoV-2 utilizando o teste rápido COVID-VIRO® disponível comercialmente. O dispositivo é composto por um anticorpo monoclonal imobilizado em uma membrana de nitrocelulose, sendo este utilizado como agente captura do

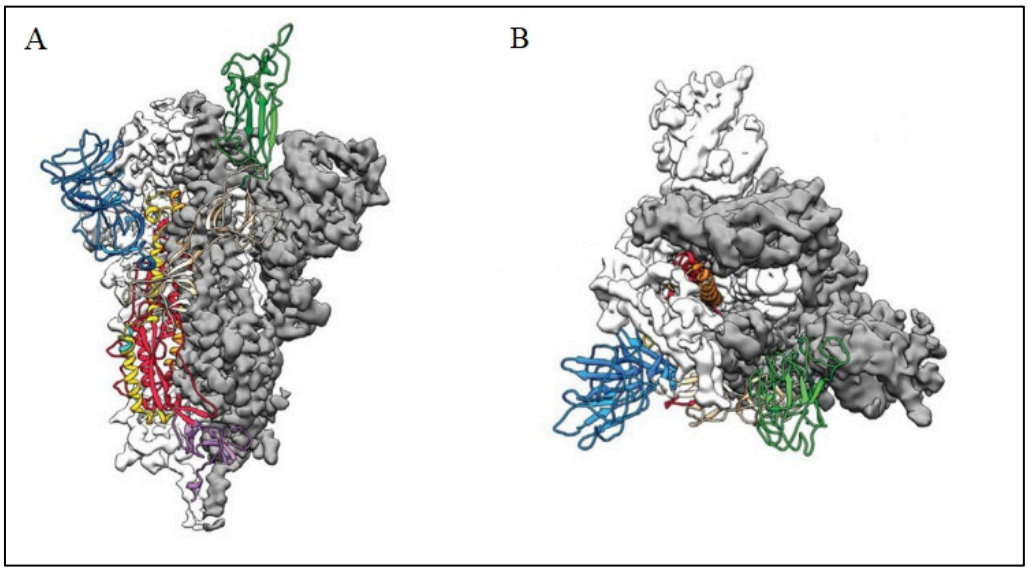
antígeno viral presente em amostras coletadas da região da nasofaringe. Os resultados alcançados pelos autores demonstraram 96,88% de especificidade e 100% de sensibilidade do teste rápido quando comparados com o padrão ouro de diagnóstico (RT-PCR), indicando ser uma importante ferramenta no controle da COVID-19 (CASSUTO *et al*., 2021).

É de suma importância ressaltar que, embora o uso desses testes sejam úteis para o diagnóstico da COVID-19, a sensibilidade do método e os resultados gerados devem ser cuidadosamente avaliados.

2.2 *RECEPTOR BINDING DOMAIN* (RBD) COMO MOLÉCULA ANTIGÊNICA NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19

O domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *receptor binding domain*) localizado na porção distal da subunidade S1 da proteína *Spike* é a região do genoma do SARS-CoV-2 que apresenta maior variabilidade genética. Esse domínio é responsável por interagir com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), contribuindo para a estabilização do estado de perfusão da subunidade S2 acarretando na fusão das membranas e dando ao início ao processo de replicação viral (Figura 36) (ANDERSEN *et al*., 2020; OTHMAN *et al*., 2020).

Figura 36 - Representação gráfica da proteína *Spike*.

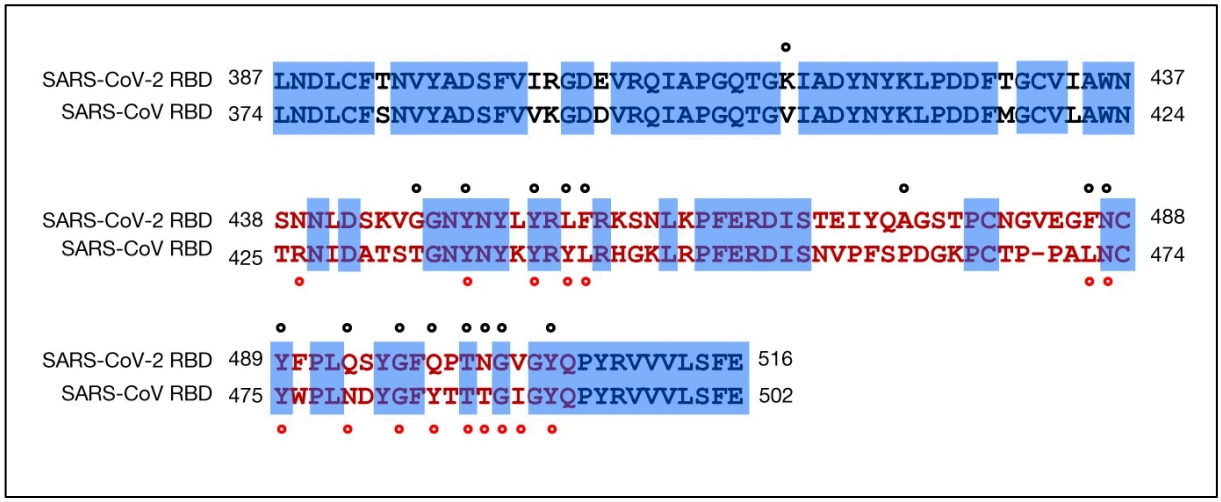


(a) Visualização do estado de perfusão da proteína S evidenciando a porção RBD (verde) na conformação ascendente. **(b)** Visualização topológica da proteína S. **Fonte:** Adaptado de STERNBERG *et al*. (2020).

Estruturalmente, a proteína RBD é formada por uma folha beta contendo cinco fitas antiparalelas (β1, β2, β3, β4 e β7) com pequenas hélices e *loops* os quais formam o núcleo da estrutura. Localizado entre as fitas β4 e β7 se encontra o motivo de ligação ao receptor (RBM, do inglês *receptor binding motif*), formado pelas fitas β5 e β6, as hélices α4 e α5 e *loops*. Esse motivo apresenta grande parte dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela interação com o receptor celular do hospedeiro (LAN *et al*., 2020).

A proteína S presente na estrutura do SARS-CoV-2 é a maior proteína já relatada entre outros vírus pertencentes ao mesmo subgênero (Sarbecovirus), com aproximadamente 1.273 resíduos de aminoácidos e 76.7 - 77.0% de identidade com a proteína encontrada no SARS-CoV. Análises filogenéticas realizadas com sequência da proteína RBD de ambos vírus mostraram que a identidade existente entre elas correspondia a 73%, indicando a alta taxa de mutação ocorrida nesta porção, o qual favoreceu o aumento da afinidade pelo receptor celular e, consequentemente, uma maior propagação do vírus (HU *et al*., 2020; HOFFMANN *et al*., 2020, TAI *et al*., 2020). A figura 37 representa o alinhamento entre as sequências primárias da proteína RBD encontrada no SARS-CoV e SARS-CoV-2.

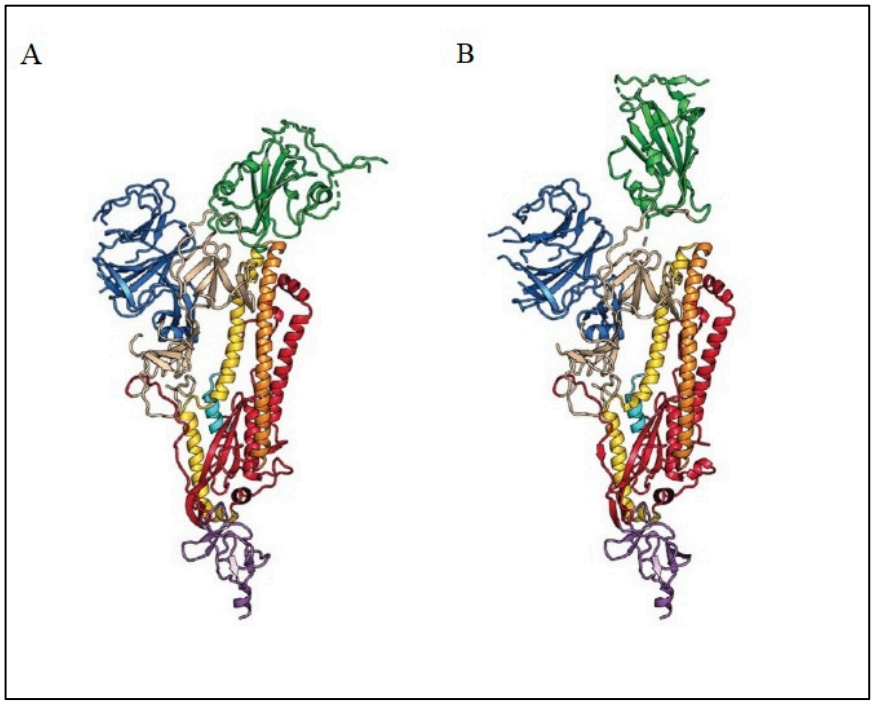
Figura 37 - Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas RBD presentes nos vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2.



Os resíduos de aminoácidos localizados dentro das caixas azuis são aqueles conservados entre as duas estruturas virais. Os pontos pretos simbolizam os resíduos responsáveis pela interação entre o SARS-CoV-2 e o receptor ECA2, enquanto os pontos vermelhos são os resíduos que promovem o reconhecimento do SARS-CoV pelo mesmo receptor. **Fonte:** Adaptado de LAN *et al*. (2020).

Análises realizadas por Cryo-EM revelaram a presença de múltiplos estados conformacionais adotados pela proteína S, podendo se apresentar no estado descendente, escondendo o domínio de ligação ao receptor, ou no estado ascendente, expondo a porção para interação com a ECA2, ou ainda no estado semiaberto. Além disso, foi observado que a ligação de alguns anticorpos neutralizantes em epítopos antigênicos da proteína RBD apenas ocorre quando mais de um domínio se apresenta em conformação ascendente (Figura 38) (STERNBERG *et al*., 2020; YUAN *et al*., 2020; WALLS *et al*., 2020).

Figura 38 - Monômero da proteína *Spike*.



(A) Porção RBD representada em verde na conformação descendente. **(B)** Porção RBD representada em verde na conformação ascendente.**Fonte:** Adaptado de STERNBERG *et al*. (2020).

2.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Escherichia coli* COMO MÉTODO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES APLICADA AO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os avanços na tecnologia do DNA recombinante alavancou a busca por diferentes sistemas de expressão com o objetivo de otimizar a produção de proteínas obtidas pelo método de expressão heteróloga. Essa técnica fornece meios para o escalonamento de bioprodutos de interesse industrial como a produção de enzimas, hormônios e anticorpos,

além de auxiliar no estudo da estrutura e função de proteínas. Os organismos utilizados na superexpressão do gene variam de acordo com a finalidade de aplicação da molécula gerada, sendo de suma importância a avaliação dos aspectos econômicos e qualitativas atribuídos a produção do bioproduto e também da pureza da proteína obtida, principalmente no que tange a produção de fármacos biológicos (GOMES *et al*., 2016; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2019). A tabela 9 adaptada de Gomes *et al*. (2016) trás os principais organismos utilizados para a expressão de proteínas recombinantes detalhando algumas vantagens e desvantagens da aplicação de cada sistema.

A expressão heteróloga em sistema bacteriano é o método mais explorado na prática da biologia molecular. A bactéria gram-negativa *E. coli* vem sendo estudada para esses propósitos desde o início da década de 1980, devido à sua alta taxa de crescimento, a qual permite a obtenção de densidades celulares abundantes em um curto período de tempo. Além disso, a facilidade de manipulação, o baixo custo de cultivo e a possibilidade de escalonamento industrial fazem com que esse organismo seja apontado como o primeiro sistema de escolha para a produção de proteínas recombinantes (JIA *et al*., 2016; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2019).

As células de *E. coli* são altamente eficientes em incorporar o DNA recombinante desconhecido e expressar as proteínas em taxas abundantes. O estudo sobre a fisiologia do microrganismo permitiu a otimização de estratégias para a obtenção de proteínas em sua forma solúvel, evitando a formação de agregados insolúveis denominado corpos de inclusão, gerados devido a superexpressão da proteína no espaço citoplasmático da célula. Com o objetivo de otimizar o dobramento das proteínas, algumas abordagens para a produção de cepas de *E. coli* engenheiradas foram desenvolvidas, como o aumento do caráter redutor do citoplasma da célula, por meio de mutações nos genes que codificam a glutationa redutase e a tioredoxina redutase, observado para a cepa de *E. coli* Origami™, ou a introdução de enzimas dissulfeto isomerase citoplasmática, a qual otimiza a formação de ligações dissulfeto, visto para a cepa de *E. coli* Shuffle™ (KLINT *et al*., 2013; ROSANO *et al*., 2014; KAUR *et al*., 2018).

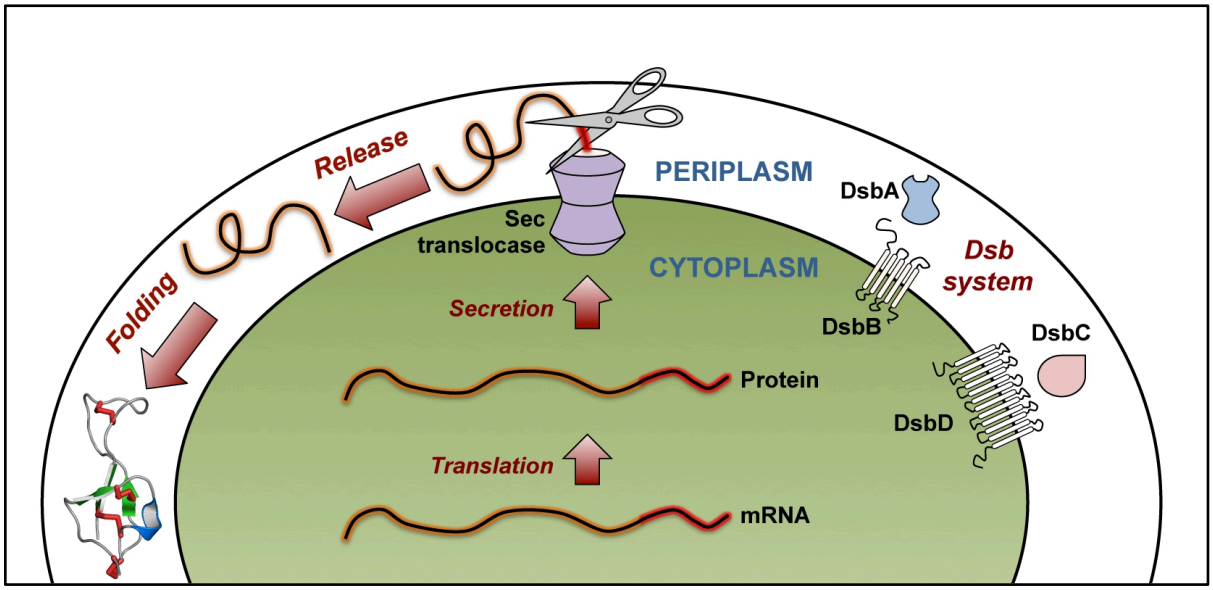
Tabela 9 - Algumas vantagens e desvantagens atribuídas aos principais sistemas de expressão utilizados na produção de proteínas recombinantes.

Sistema de Expressão	Vantagens	Desvantagens
Bactérias		
Escherichia coli	Fácil Rápido Econômico Alta taxa de crescimento Capacidade de fermentação contínua	Não possui maquinaria necessária para remover íntrons das transcrições Gene desconhecido pode conter sequências que atuam como sinais de terminação, resultando na interrupção prematura e perda da expressão gênica Viés de códon Falta de modificações pós-traducionais A glicosilação é extremamente incomum em bactérias Produção de proteínas na forma insolúvel denominados corpos de inclusão Degradação de proteínas Acúmulo de endotoxinas
Bacillus subtilis	Não produz LPS / endotoxinas Pode ser transformado facilmente com muitos bacteriófagos e plasmídeos Capaz de secretar proteínas extracelulares funcionais diretamente no meio de cultura	Produção de proteases extracelulares que podem reconhecer e degradar proteínas heterólogas Instabilidade de plasmídeos Expressão reduzida ou a não expressão da proteína de interesse
Leveduras	Crescimento rápido em meio de baixo custo Modificações pós-traducionais adequadas Segurança do sistema é garantida Não ocorre produção de endotoxinas	Hiperglicosilação de proteínas Viés de códon Algumas leveduras apresentam ineficiente na secreção de proteínas no meio de crescimento, levando à retenção intracelular
Fungo filamentoso	Alto nível de expressão	Complexo Falta de conhecimento relacionado à fisiologia do sistema
Baculovírus / inseto	Alto nível de expressão Modificações pós-traducionais adequadas Seguro para vertebrados Excelente ferramenta para produção de glicoproteína recombinante	Expressão contínua não é possível Condições de cultura mais exigentes
Células de mamíferos	Enovelamento adequado de proteínas Modificações pós-traducionais adequadas e montagem do produto Glicosilação adequada	Alto custo Tecnologia complicada Possível contaminação com vírus animais
Plantas transgênicas	Fácil expansão com baixo custo As proteínas podem ser localizadas em diferentes órgãos e estágios de crescimento da planta Alto rendimento	Os níveis de expressão dependem do alvo Ensaios funcionais ainda a serem desenvolvidos
Animais transgênicos	Enovelamento adequado de proteínas Modificações pós-traducionais adequadas e montagem do produto Glicosilação adequada	Período de produção relativamente mais longo Baixo rendimento Custos mais altos

Fonte: adaptado de GOMES *et al*. (2016).

Uma outra abordagem para obter estruturas corretamente dobradas é o direcionamento da secreção da proteína recombinante para o espaço periplasmático da célula. O espaço periplasmático é uma região situada entre a membrana interna e externa da célula bacteriana, sendo um ambiente ideal para a produção de uma gama de proteínas recombinantes funcionais, principalmente para aquelas que apresentam algum efeito tóxico para a célula ou necessita de um ambiente altamente oxidante para a formação adequada de ligações dissulfeto (KLINT *et al*., 2013; SARKER *et al*., 2019). A figura 39 ilustra o mecanismo de expressão heteróloga no espaço periplasmático.

Figura 39 - Expressão heteróloga de proteínas recombinantes no espaço periplasmático da célula bacteriana.



A proteína traduzida no citoplasma da célula bacteriana é transportada em seu estado desdobrado para a região periplasmática via sistema Sec translocase. Em seguida, a proteína sofre ação de chaperonas e da maquinaria do sistema Dsb (do inglês *disulfide bond formation*) para a otimização das ligações dissulfeto se necessário. **Fonte:** adaptado de KLINT *et al*. (2013).

O direcionamento da estrutura para o espaço periplasmático pode ser alcançado por meio da inserção de um peptídeo sinal na extremidade da proteína recombinante, o qual é clivado pelo sistema Sec translocase antes da molécula ser liberada na região periplasmática. As estruturas mais utilizadas para esse direcionamento são os peptídeos Lpp, LamB, LTB, MalE, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, PelB, PhoA, PhoE ou SpA (ROSANO *et al*., 2014; KAUR *et al*., 2018).

Com base no que foi exposto, as vantagens apresentadas pelo uso do sistema de *E. coli* e os métodos de otimização utilizados na expressão de proteínas recombinantes no espaço periplasmático torna-se essa abordagem ideal para a produção dos anticorpos scFv recombinantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Expressar e a purificar os anticorpos scFv construídos por métodos *in silico* para a aplicação no diagnóstico direto da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar os genes sintéticos em construção para expressão em sistema bacteriano direcionado ao periplasma de ambos os anticorpos scFv: scFv-CR3022 e scFv MAD22;

- Expressar o scFv-CR3022 e scFv MAD22 e realizar testes de padronização de expressão para otimização de sua produção;

- Padronizar a purificação do anticorpo scFv-CR3022 e scFv MAD22 recombinante;

- Padronizar a etapa de diálise para os anticorpos scFv-CR3022 e scFv MAD22;

- Avaliar a estabilidade de ambas proteínas em diferentes temperaturas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESCOLHA DO VETOR DE EXPRESSÃO, CLONAGEM DO GENE SINTÉTICO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ATRIBUÍDOS ÀS PROTEÍNAS

A escolha do vetor para a expressão dos anticorpos scFv foi feita por meio de uma busca criteriosa na literatura com o objetivo de determinar as melhores condições e compatibilidade entre as células de *E. coli* utilizadas para a expressão das proteínas e o vetor selecionado. Em seguida, a clonagem da sequência gênica no vetor foi realizada via empresa FastBio LTDA, e a construção completa, previamente confirmada por digestão enzimática e sequenciamento de DNA, foi ressuspendido em água ultrapura, de acordo com as orientações dos fabricantes, e utilizada para a transformação em células de *E. coli* DH5α competentes por meio da técnica de choque térmico. As características individuais de ambos anticorpos, como o peso molecular, o ponto isoelétrico (pI) e o valor do coeficiente de absortividade molar (ϵ), essenciais nas etapas de avaliação da expressão e purificação das proteínas recombinantes, foram preditos por meio da ferramenta de bioinformática *Compute pI/Mw* e ProtParam disponibilizada pela plataforma ExPASy (do inglês *expert protein analysis system*). Para isso, a sequência primária das duas proteínas foram submetidas a interface gráfica da ferramenta para a realização dos cálculos referentes a esses parâmetros.

4.2 PRODUÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES USANDO CLORETO DE CÁLCIO

O preparo de células competentes de *E. coli* cepa DH5α e BL21(DE3)-RIL prosseguiu pela metodologia utilizando cloreto de cálcio ($CaCl_2$) adaptada de Sambrook & Russel (2000). Desse modo, uma colônia de bactéria previamente plaqueada em meio Luria Bertani (LB) ágar estéril e incubada por 16h a temperatura de 37ºC foi selecionada e transferida para um erlenmeyer de 1L contendo 300 mL de meio LB líquido estéril. Em seguida, o inóculo foi incubado a 37ºC sob agitação de 200 rpm e seu crescimento foi acompanhado por meio do valor da densidade óptica no comprimento de onda 600 nm ($D.O._{600}$). A $D.O._{600}$ é uma medida utilizada para estimar a concentração de células presentes no meio, de modo que esses valores não excedam 10^8 células/mL, correspondendo a $D.O._{600} \sim 0.4$. O tempo estimado para atingir essas concentrações varia de 3 a 4 horas (Sambrook & Russel, 2000). Logo após, as células foram transferidas para tubos falcon de 50 mL previamente esterilizados e deixados no

banho de gelo por cerca de 10 minutos. Ao término desse processo, as células foram recuperadas por centrifugação a 4.100 rpm durante 10 minutos sob a temperatura de 4ºC. O sobrenadante então foi descartado e os tubos foram vertidos em toalhas de papel estéril durante 1 minuto para a secagem do *pellet* formado. Em seguida, os *pellets* foram ressuspendidos gentilmente em 10 mL de solução de $CaCl_2$ 0,1 M gelado e estéril, seguido do mesmo método para a recuperação das células viáveis descrito acima, o qual consiste na sedimentação do meio (rotação de 4.100 rpm/ 10 minutos/ 4ºC), descarte do sobrenadante e secagem dos *pellets* formado. Esse procedimento de lavagem foi realizado duas vezes, sendo que na segunda vez, as células ressuspendidas em $CaCl_2$ 0,1 M foram mantidas em banho gelado por 30 minutos. Após recuperar as células, o *pellet* foi ressuspendido em solução de $CaCl_2$ 0,1 M gelado contendo 15% de glicerol para estocagem sob refrigeração. As alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e mantidas sob -80ºC. Vale ressaltar que, para todas as etapas, foram utilizados soluções e vidrarias estéreis e também foi realizado controle positivo e negativo das células.

4.3 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES POR MEIO DA TÉCNICA DE CHOQUE TÉRMICO

O processo de transformação das células competentes DH5α e BL21(DE3)-RIL pelo método de choque térmico foi adaptado do protocolo proposto por Sambrook & Russel (2000). Desse modo, um microtubo contendo 100 µL das células previamente preparadas e armazenadas a -80ºC foi descongelado em banho de gelo e adicionado 1 µL do DNA ressuspendido em água ultrapura. As células foram homogeneizadas gentilmente e deixadas em repouso no gelo durante 30 minutos. É válido ressaltar que todo o procedimento foi executado no fluxo laminar previamente higienizado com solução de álcool 70% para evitar contaminações. Além disso, controles positivos e negativos também foram realizados para obtenção de melhores resultados (Sambrook & Russel, 2000). Após o tempo preconizado, iniciou-se o processo de choque térmico. Como essa etapa é crucial para o sucesso da transformação, o tempo e as temperaturas devem ser rigorosamente respeitados. Desse modo, o microtubo contendo as células foi submetido ao banho-maria na temperatura de 42ºC por exatamente 90 segundos, sendo em seguida transferido para o banho de gelo por 2 minutos.

Ao final da etapa de choque térmico, foi adicionado 900 µL de meio LB estéril às células recém transformadas para a recuperação da viabilidade celular, e em seguida, os

microtubos foram incubados a 37ºC sob agitação de 200 rpm durante 50 minutos. Enquanto isso, placas de petri estéreis contendo 20 mL de meio LB ágar e canamicina na concentração final de 50 μg/mL foram produzidas para seleção das células transformadas. Após o tempo de recuperação, as células foram concentradas por centrifugação durante 1 minuto a 4.100 rpm e o *pellet* formado foi ressuspendido em 40 μL do sobrenadante. Com o auxílio da alça de Drigalski, as células semeadas no centro da placa de petri foram espalhadas pelo meio LB ágar até que ocorresse o esgotamento da placa, sendo, posteriormente, incubadas à 37ºC de modo invertida durante um período de 12-16 horas. No dia seguinte, uma colônia isolada foi transferida para 10 mL de meio LB estéril e incubada sob a temperatura de 37ºC a 200 rpm durante 12-16 horas para a etapa de extração do DNA plasmidial. Esse protocolo foi realizado tanto para o plasmídeo contendo o gene do anticorpo scFv-CR3022 quanto para aquele apresentando o gene para o anticorpo scFv MAD22.

4.4 ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS EM GLICEROL 20%

As células bacterianas foram estocadas em glicerol 20% sob a temperatura de -80ºC. Para isso, em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 800 μL de cultura bacteriana seguido da adição de 200 μL de glicerol esterilizado previamente por autoclavagem. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado e a manipulação das células foi realizada no fluxo laminar higienizado. Durante o processo, as células foram mantidas em banho de gelo. Ao final do procedimento, os microtubos foram armazenados em ultra-freezer -80ºC para uso posterior.

4.5 MINIPREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL POR LISE ALCALINA E SDS

O método de extração do DNA plasmidial por lise alcalina e dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada de acordo com o protocolo empregado por Sambrook & Russel (2000) de forma adaptada. O modo de preparo das soluções de lise alcalina I, II e III se encontra disponível no volume 3 da coleção, de modo adaptado, e também no ANEXO B.1. A metodologia proposta pelos autores pode ser dividida em três principais etapas: primeiramente ocorre o preparo da célula, seguido da lise celular e por fim a recuperação do DNA plasmidial (Sambrook & Russel, 2000).

4.5.1 Preparação da célula bacteriana

As células bacterianas previamente inoculadas em meio LB estéril por 16 horas a 37ºC sob rotação de 200 rpm foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 8.000 rpm durante 30 a 60 segundos sob refrigeração de 4ºC. A cultura não utilizada deve ser mantida em banho de gelo até seu manuseio. Em seguida, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente para a secagem do *pellet* formado.

4.5.2 Processo de lise celular para a obtenção do DNA plasmidial

O *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de solução alcalina I, para o rompimento das células, seguido da agitação vigorosa do microtubo utilizando o vortex. Logo após, 200 µL da solução alcalina II gelado foi adicionado às células e, cuidadosamente por inversão, o microtubo foi homogeneizado 5 vezes e mantido em banho de gelo durante 5 minutos. Ao término do processo, foi adicionado 150 µL da solução alcalina III e o microtubo foi agitado cuidadosamente mais uma vez por inversão e deixado em repouso em banho de gelo de 3-5 minutos. Nessa etapa observou-se a formação de um precipitado branco. O microtubo então foi centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos sob refrigeração de 4ºC e o sobrenadante formado foi transferido para um novo microtubo. A etapa de lavagem com fenol-clorofórmio sugerida não foi realizada.

4.5.3 Recuperação do DNA plasmidial

Para que ocorra a precipitação do DNA, foi adicionado às células 500 µL de etanol puro e em seguida o microtubo foi homogeneizado por inversão e deixado em repouso por 5 minutos sob a temperatura de -20ºC, sendo posteriormente submetido a centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e essa etapa foi novamente realizada utilizando 200 µL de etanol 70% gelado. Após a eliminação do etanol, o microtubo foi deixado em temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos para a completa evaporação do solvente e secagem do *pellet* formado. O DNA plasmidial então foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura livre de nuclease e quantificado pelo NanoDrop™ Thermofischer. A qualidade da amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente foi armazenada sob refrigeração de -20ºC.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL UTILIZANDO KIT COMERCIAL: *PureYield™ Plasmid Miniprep System*

A extração do DNA plasmidial da célula de *E. coli* DH5α transformada foi prosseguida pelo uso do kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System* para obtenção de amostras com alto teor de pureza. O protocolo de purificação do DNA por meio de centrifugação estipulado pelos fabricantes é composto, basicamente, de três etapas: a primeira etapa é referente a lise celular, seguido da lavagem e eluição das amostras. As amostras foram realizadas em triplicata.

4.6.1 Etapa de lise celular para a obtenção do DNA plasmidial

Em um microtubo de 1,5 mL, foi adicionado o mesmo volume de cultura bacteriana, sendo posteriormente submetido ao processo de centrifugação durante 30 segundos a 8.000 rpm para a decantação das células. O sobrenadante foi descartado e esse passo foi realizado novamente para o volume final de 3 mL de cultura. O *pellet* formado foi ressuspendido em 600 µL de água ultrapura e, em seguida, 100 µL de tampão de lise (disponibilizado pelo kit) foi adicionado ao microtubo e homogeneizado cuidadosamente 6 vezes por inversão. Ao término do processo, 350 µL de solução de neutralização gelado (disponibilizado pelo kit) foi acrescentado e homogeneizado pelo mesmo método descrito acima, e posteriormente, centrifugado a 8.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma mini coluna *PureYield™* (disponibilizado pelo kit), tomando cuidado para não contaminá-la com os debris celulares, sendo em seguida colocada em um tubo coletor (disponibilizado pelo kit) e centrifugada a 8.000 rpm durante 30 segundos. O resíduo depositado no tubo após a centrifugação foi descartado e a coluna foi novamente colocada no mesmo tubo para a etapa de lavagem.

4.6.2 Etapa de lavagem das amostras para remoção de endotoxinas

Essa etapa consiste na adição de 200 µL da solução de remoção de endotoxina na coluna (disponibilizado pelo kit), seguido da centrifugação a 8.000 rpm durante 30 segundos. Logo após, é acrescentado na coluna 400 µL de solução de lavagem (disponibilizado pelo kit), sendo novamente repetido o processo de centrifugação.

4.6.3 Etapa de eluição e armazenamento das amostras

Ao final do processo, a coluna foi colocada em um novo microtubo de 1,5 mL estéril, seguido da adição de 20 μL de água livre de nuclease e deixada em repouso durante 1 minuto em temperatura ambiente. O microtubo então foi centrifugado a 8.000 rpm por 30 segundos e o DNA eluído foi submetido a quantificação pelo NanoDrop™ Thermofischer seguido da análise por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras de DNA plasmidial foram armazenadas a -20ºC para uso posterior.

4.7 ANÁLISE DE QUALIDADE DO DNA PLASMIDIAL POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%

A análise referente a qualidade da amostra do DNA plasmidial extraído da célula DH5α foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% (m/v). O protocolo foi adaptado de Sambrook & Russel (2000). A porcentagem da concentração do gel varia de acordo com o tamanho do fragmento de DNA analisado, de modo que o gel utilizado na análise abrange fragmentos com peso molecular variando entre 250 bp a 12 kb. Além disso, a solução tampão de escolha, tanto para o preenchimento da cuba de corrida, quanto para a diluição da agarose para a produção do gel, foi o tampão TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA) nas devidas concentrações. A composição da solução pode ser consultada no ANEXO B.2 (Sambrook & Russel, 2000).

4.7.1 Preparo do gel de agarose 1% (m/v)

O preparo do gel de agarose a 1% (m/v) foi realizado transferindo uma quantidade do pó previamente pesado para um erlenmeyer, seguido da diluição desse em TBE 0,5X, de modo que o volume final da solução não ocupe mais do que a metade da vidraria. As proporções usadas para a confecção do gel, assim como o volume do erlenmeyer, variam de acordo com o tamanho da cuba de corrida disponível e também com a quantidade de amostras aplicadas. Em seguida, a solução foi aquecida cuidadosamente em microondas para que a agarose se dissolva completamente, tomando cuidado com a fervura da solução. Logo após, a solução foi resfriada a 55ºC, banhando cuidadosamente a vidraria em água corrente, e vertida no suporte previamente montado contendo os pentes responsáveis pela formação das

canaletas. O gel foi deixado em repouso sob temperatura ambiente para que sua polimerização.

4.7.2 Montagem da corrida da eletroforese em gel de agarose

Após o processo de gelificação, o suporte foi mergulhado na cuba contendo tampão TBE 0,5X e as amostras homogeneizadas em tampão 6X, sendo 3 µL da amostra, 2 µL de tampão e 1 µL de água. A constituição do tampão de amostra 6X pode ser consultada no ANEXO B.2. A corrida da eletroforese foi realizada a 120V e o término do experimento foi acompanhado de acordo com a corrida do corante presente no tampão aplicado na amostra.

4.7.3 Detecção do DNA plasmidial em gel de agarose

Após a corrida da eletroforese, a detecção das bandas referentes ao DNA plasmidial foi realizada mergulhando o gel de agarose em solução contendo brometo de etídio durante 30 minutos. Esse corante se liga à molécula de DNA, interagindo com as bases nitrogenadas por meio de forças de Van der Waals e fluorescendo quando submetido à região da luz ultravioleta (UV). A composição da solução contendo brometo de etídeo pode ser consultada no ANEXO B.2.

4.8 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DOS ANTICORPOS scFv E PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA ADOTADA

O processo de expressão dos anticorpos scFv foi feito pela metodologia adaptada de Sambrook & Russel (2000). Desse modo, uma colônia de *E. coli* cepa BL21(DE3)-RIL transformada com o gene de expressão e previamente plaqueada em meio LB ágar foi selecionada e transferida para 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina na concentração final de 50 µg/mL, sendo, posteriormente, incubada a 37ºC durante 12 horas sob agitação de 200 rpm. O pré-inóculo preparado será utilizado nos testes de padronização da indução (Sambrook & Russel, 2000). Esse procedimento foi realizado tanto para o gene pET27b-scFv-CR3022 quanto para o pET27b-scFv-MAD22.

4.8.1 Teste de padronização da indução dos anticorpos scFv

O pré-inóculo foi utilizado para semear a bactéria recombinante em 1L do inóculo. O crescimento da cultura foi verificado por meio da D.O. no comprimento de onda de 600nm, analisando nos intervalos de 1 hora até que essa atinja o valor de 0,6. Então, o tempo zero foi coletado e a indução foi iniciada com a adição de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) na concentração final de 1,0 mM. A cultura foi submetida a diferentes temperaturas sob a rotação de 180 rpm. Alíquotas de 20 mL de cultura foram retiradas nos tempos estipulados para o teste de expressão. Essas amostras foram posteriormente centrifugadas e o *pellet* formado foi armazenado a -20ºC para próximos processamentos. A expressão dos anticorpos scFv foram testadas nas temperaturas de 15ºC, 25ºC, 30ºC e 37ºC durante 48 horas.

4.8.2 Processamento das amostras: recuperação das proteínas da fração periplasmática

A obtenção das proteínas recombinantes direcionadas para o espaço periplasmático foi realizada pelo método de extração proposto por Ghamghami *et al*. (2020) por meio da utilização do tampão TES (Tris-EDTA-Sacarose) (ANEXO B.3). O *pellet* de indução foi ressuspendido no tampão e deixado em repouso no banho de gelo durante 1 hora. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 8.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a quantificação das proteínas periplasmáticas e análise da amostra (GHAMGHAMI *et al*., 2020).

4.8.3 Processamento das amostras: recuperação das proteínas da fração solúvel

O precipitado formado na etapa de extração das proteínas periplasmáticas foi submetido ao processo de recuperação das proteínas presentes na fração solúvel, onde o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de tampão de lise (ANEXO B.3) e, em seguida, foi adicionado inibidores de proteases (pepstatina A, aprotinina, leupeptina e lisozima) para evitar a degradação das proteínas recombinantes. A amostra então foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos e, logo após, sonicada por 1 minuto na amplitude de 30A e pulsos de 10 segundos *on* e 10 segundos *off*. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado a 8.000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 4ºC e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi transferido para um novo tubo para o processo de quantificação e análise da amostra.

4.8.4 Processamento das amostras: recuperação das proteínas dos corpos de inclusão

Novamente, o *pellet* formado foi submetido ao protocolo para recuperação das proteínas dos corpos de inclusão por meio do uso de uréia. Desse modo, adicionou-se ao tubo contendo o precipitado, 1 mL de tampão de solubilização (ANEXO B.3) e homogeneizou-se cuidadosamente. Em seguida, a amostra foi incubada em banho-maria à 55ºC durante 20 minutos, sendo que em cada 10 minutos a amostra foi homogeneizada em vortex. Ao término do processo, a amostra foi sonicada por 1 minuto na amplitude de 30A e pulsos de 10 segundos *on* e 10 segundos *off* e, logo após, centrifugada a 8.000 rpm durante 15 minutos na temperatura de 4ºC. O sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas em uréia foi transferido para um novo tubo e o *pellet* formado foi descartado.

4.9 MÉTODOS DE ANÁLISES DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE E *WESTERN BLOTTING*

Após o processamento das amostras, as análises de qualidade e identificação das proteínas recombinantes foram feitas por meio do método de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*) e *Western blotting*.

4.9.1 Separação das proteínas recombinantes presentes nas amostras: SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, é uma técnica amplamente utilizada para obter a separação analítica de proteínas presentes em amostras de expressão. O método consiste na desnaturação inicial da macromolécula, por meio do detergente aniônico, seguido da interação entre os componentes, transmitindo carga negativa às proteínas de modo proporcional a sua massa molecular. A aplicação de uma corrente elétrica faz com que essas proteínas percorram uma matriz de gel porosa composta por acrilamida e bis acrilamida, levando a separação das moléculas com base na relação massa/carga apresentada pela amostra. Em seguida, o gel pode ser corado, para a visualização das bandas formadas pelas proteínas, ou submetido a análises de *Western blotting* (NOWAKOWSKI *et al*., 2014).

4.9.1.1 *Preparo do gel de policrilamida 12%*

O preparo do gel de poliacrilamida foi realizado em duplicata para que um fosse, posteriormente, corado com *coomassie blue*, e o outro utilizado na etapa de identificação por *Western blotting*. O gel de separação e o de empilhamento foram produzidos de acordo com a metodologia adotada por Sambrook & Russel (2000), apresentando os mesmos componentes, porém, divergindo no teor de acrilamida e pH para cada fase (gel de empilhamento: acrilamida 5% e 1,0 M Tris pH 6.8; gel de separação: acrilamida 12% e 1.5 M Tris pH 8.8) (ANEXO B.4). Desse modo, foi realizado o preparo da solução do gel de separação sendo posteriormente vertido em um suporte de 1,5 mm de espessura previamente montado até a polimerização do sistema. Logo após, foi produzida a solução para o gel de empilhamento, a qual também foi vertida no suporte já contendo o gel de separação sólido, seguido da introdução do pente para que haja a formação das canaletas, onde as amostras foram aplicadas. O suporte então foi deixado em temperatura ambiente para a completa geleificação das fases (Sambrook & Russel, 2000).

4.9.1.2 *Corrida das amostras em SDS-PAGE*

As amostras foram acrescentadas de tampão contendo β-mercaptoetanol e submetidas ao banho-maria a 90ºC durante 5 minutos. O suporte com os géis foi submerso em uma cuba preenchida com tampão Tris-Glicina em pH 8.3 para que as amostras fossem aplicadas em cada canaleta. Em seguida, a corrida da eletroforese iniciou-se a 70V durante 20 minutos de modo que todas as amostras entrem no gel de separação ao mesmo tempo, coordenado pelo alinhamento promovido por meio do gel de empilhamento. A voltagem então, foi ajustada para 120V e a corrida foi acompanhada observando o corante presente no tampão de amostra percorrendo o gel.

4.9.1.3 *Visualização das bandas de expressão: Coomassie blue*

Ao término do processo, as bandas de expressão foram visualizadas corando um dos géis em *coomassie blue*, deixando-o em contato com a solução por pelo menos 1 hora. Logo após, o gel foi descorado por etapas de lavagens com solução de etanol e metanol até que seja possível visualizar o perfil de expressão das proteínas recombinantes.

4.9.2 Identificação das proteínas recombinantes presentes nas amostras: *Western blotting*

A identificação das proteínas recombinantes de interesse foi feita pelo método de *Western blotting* (WB). Essa técnica, amplamente utilizada no campo da biologia molecular, se fundamenta em três principais etapas, as quais envolvem a transferência das amostras para uma membrana de alta afinidade pelas proteínas seguido do seu bloqueio para evitar ligações inespecíficas; o tratamento com anticorpos específicos para a proteína de interesse e a incubação com um segundo anticorpo conjugado a um marcador que pode ser colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente); e a produção e detecção do sinal emitido por esse sanduíche de anticorpos (BASS *et al*., 2016).

4.9.2.1 *Etapa de eletrotransferência em sistema semi-seco e bloqueio da membrana*

O processo de eletrotransferência em sistema semi-seco consiste na aplicação de um campo elétrico na orientação perpendicular ao gel contendo as proteínas separadas na etapa de SDS-PAGE, de modo que estas se movam para uma membrana de alta afinidade à amostra, normalmente feita de nitrocelulose. A vantagem dessa técnica é a velocidade e a integridade da transferência (MAHMOOD *et al*., 2012). Para isso, o gel e a membrana foram montados em um sanduíche contendo papéis de filtro embebidos em três diferentes soluções de transferência. As soluções de transferência I e II são produzidas a partir de concentrações diferentes de Tris-base em 20% de metanol em pH 10.4. Para a solução III, além desses componentes foi adicionado 0,04 M de ácido capróico em pH 9.4. Desse modo, 4 papéis de filtro foram mergulhados na solução I e 2 papéis foram embebidos na solução II juntamente com a membrana de nitrocelulose. Em seguida, o gel de poliacrilamida foi posicionado em cima da membrana, tomando cuidado para evitar a formação de bolhas e o sistema foi finalizado com a adição de 6 papéis imersos em solução III. A constituição de cada solução de transferência utilizada pode ser consultada no ANEXO B.5.

A corrida da eletrotransferência foi realizada a 120V durante 50 minutos sob a amperagem de 400 mA. Ao término do processo, a membrana de nitrocelulose foi corada de modo reversível pela solução Ponceau com o objetivo de confirmar a eficiência da transferência, seguido da lavagem com PBS-T 0,1%. Logo após, deu-se início a etapa de bloqueio da membrana. A etapa de bloqueio é de extrema importância para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana, sendo normalmente realizada pela

adição de BSA 5% (m/v) ou leite em pó desnatado diluído em PBS-T 0,1%, de modo a reduzir resultados falso-positivos e obter melhores resoluções das marcações das proteínas (MAHMOOD *et al*., 2012; JENSEN, 2012). A membrana então foi incubada com solução de bloqueio a 5% (m/v), composta por leite em pó e PBS-T 0,1%, e deixada em mesa agitadora *overnight*.

4.9.2.2 *Etapa de incubação com os anticorpos primário e secundário*

Ao final da etapa de bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com solução PBS-T 0,1% sob agitação com duração de 5 minutos para cada lavagem. Em seguida, foi incubada com anticorpo policlonal IgG anti-cauda de histidina produzido em camundongo (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:5000 e foi deixada novamente sob agitação durante 1 hora. O anticorpo primário identifica a região formada por seis resíduos de histidina localizado na porção C-terminal da proteína recombinante. Logo após, foi realizado novamente a lavagem da membrana pelo mesmo processo descrito anteriormente. As etapas de lavagem auxiliam na remoção dos anticorpos não ligados, minimizando assim, possíveis ruídos durante a revelação da membrana (MAHMOOD *et al*., 2012). Após a última lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase produzido em cabra na diluição 1:1000 e foi deixado sob agitação por 1 hora. Os anticorpos secundários são utilizados para a detecção indireta do antígeno por meio de sua ligação à porção Fc do anticorpo primário, seguido da emissão de sinal quando submetido a etapa de revelação (BASS *et al*., 2016).

4.9.2.3 *Etapa de revelação pela a adição de substrato*

Percorrido o período de incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada com PBS-T 0,1%, adotando o mesmo método detalhado acima, dando início a etapa de revelação do *Western blotting*. Para isso, 10 mL de uma solução contendo $NiCl_2$ 0,3%, Tris-HCl 1 M em pH 7.6, água destilada e 10 mg 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foi previamente preparada em um tubo falcon protegido contra a luz e, logo após, vertido sobre a membrana (ANEXO B.6). Em seguida, foi adicionado 20 µL de H_2O_2 35% (v/v) na solução anterior e aguardou-se até o aparecimento das bandas. Pelo método de detecção por colorimetria, a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário na presença de peróxido de hidrogênio, oxida a molécula de DAB gerando um produto insolúvel de cor amarronzada,

indicando a presença da proteína de interesse, sendo possível interromper essa reação com a adição de água destilada ao meio (BASS *et al*., 2016).

4.10 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv-CR3022 E scFv MAD22

Uma vez que o gene sintético foi desenhado para direcionar a expressão dos anticorpos recombinantes no espaço periplasmático da membrana celular da *E. coli*, apenas essas frações foram utilizadas durante o processo de purificação. Desse modo, as amostras de aproximadamente 10 mL, obtidas a partir de um *pellet* de 100 mL, foram filtradas em membrana de 0,45 µm e aplicadas no fluxo de 0,5 mL/min em uma coluna de níquel HisTrap™ Crude FF de 1 mL por meio do sistema cromatográfico FPLC (do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*) AKTA PURIFIER UPC10 (GE *Healtcar*e) previamente equilibrado com o Tampão A (ANEXO B.7). Durante esse processo, uma alíquota referente ao volume não ligado foi coletada para avaliar a capacidade de adesão da proteína na coluna de níquel. Em seguida, o sistema foi lavado com aproximadamente 10 mL de Tampão A, sendo também coletado uma alíquota de amostra para analisar a eficiência dessa ligação. Logo após, deu-se início a etapa de eluição.

A etapa de eluição prosseguiu-se com a aplicação no sistema de 100% de Tampão B contendo 500 mM de imidazol para que as proteínas se desliguem da coluna e possam ser posteriormente coletadas. Não foi necessário utilizar a eluição por gradiente de concentração de Tampão B. As frações de 1 mL do eluído foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL sob refrigeração de 4ºC para análises posteriores. A composição do Tampão B também pode ser consultada no ANEXO B.7.

4.11 ETAPA DE DIÁLISE EM TAMPÃO CARBONATO DAS AMOSTRAS DE ANTICORPOS PURIFICADOS E TESTE DE ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS

A etapa de diálise das amostras purificadas foi realizada com o objetivo de minimizar a interferência ocorrida durante o processo de quantificação do teor de proteína ocasionada pela alta concentração de imidazol presente no tampão de eluição (Tampão B). Desse modo, 1 mL de cada amostra foi aplicada em 6 cm de membrana de diálise de 33 mm de diâmetro sendo posteriormente submersa em 200 mL de tampão carbonato 20 mM em pH 9.6 durante 24 horas sob refrigeração de 4ºC. Em seguida, as amostras foram quantificadas e analisadas

por SDS-PAGE e *Western blotting*. A constituição do tampão carbonato pode ser consultada no ANEXO B.8.

As amostras também foram submetidas a testes de estabilidade para determinar a melhor temperatura para seu armazenamento. Para isso, três alíquotas para cada anticorpo foi deixada em 25ºC, sob refrigeração a 4ºC e -20ºC, respectivamente, durante um período de 24h, sendo posteriormente avaliadas e gel de poliacrilamida.

4.12 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA: ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO EM 280nm (A280)

Devido a grande presença de resíduos de aminoácidos aromáticos na estrutura de ambos anticorpos, a quantificação das proteínas foi possível ser realizada pelo método de espectrofotometria de absorção no comprimento de onda ultravioleta de 280 nm (AITKEN; LEARMONTH, 2002). A análise das amostras foi feita aplicando o volume de 500 µL da solução contendo proteína em uma cubeta de quartzo e submetida a leitura em espectrofotômetro em 280 nm. Os resultados obtidos foram calculados empregando a lei de Lambert-Beer descrita pela equação (4.0) abaixo:

$$c = \frac{A}{\epsilon . l} \tag{4.0}$$

Onde, c representa a concentração da proteína dada em mg/mL, A é a absorbância em 280 nm, ϵ é o valor do coeficiente de absortividade molar obtida pelo ProtParam l é o caminho óptico percorrido pelo feixe de luz.

4.13 CÁLCULO DO RENDIMENTO TOTAL DA PROTEÍNA

O rendimento dos anticorpos recombinantes prosseguiu-se, primeiramente, pelo cálculo da massa de proteína presente em 1 mL de amostra purificada de concentração pré-estabelecida. Em seguida, o rendimento foi determinado dividindo a massa pelo volume do *pellet* de indução purificado dividido por 1000 mL, como demonstrado pela equação 5.0:

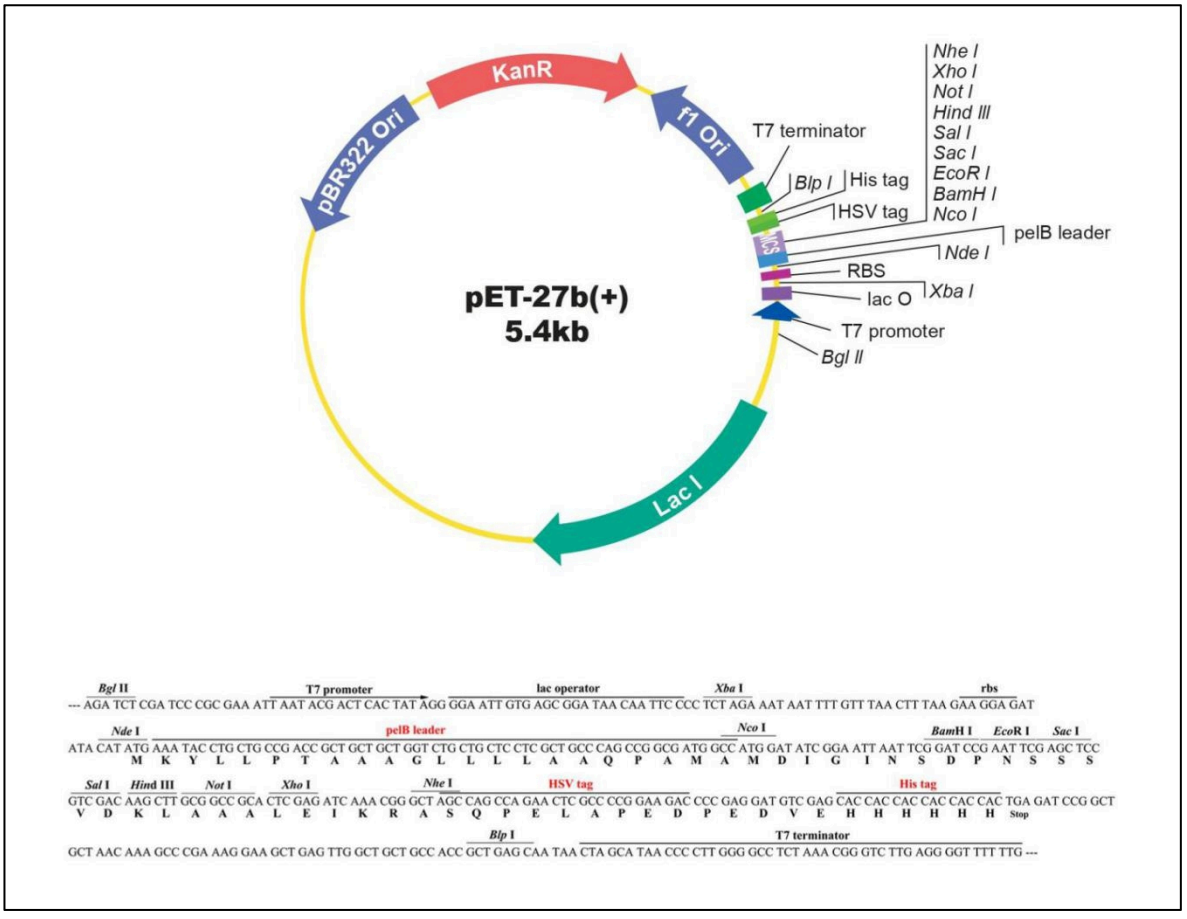
$$Rendimento = \frac{m}{(V_{pellet}/1000\ mL)} \tag{5.0}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E DESENHO DO GENE SINTÉTICO A SER CLONADO E UTILIZADO NA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACTERIANO

A escolha do vetor foi baseada na metodologia adotada por Miller *et al*., (2005), onde os pesquisadores utilizaram o vetor pET27b(+) para expressar e purificar anticorpos scFv em células de *E. coli*, obtendo as proteínas recombinantes a partir de diferentes frações da célula bacteriana (MILLER *et al*, 2005). A figura 40, disponibilizada pela empresa GenScript, esquematiza de forma detalhada a organização do vetor de expressão pET27b(+).

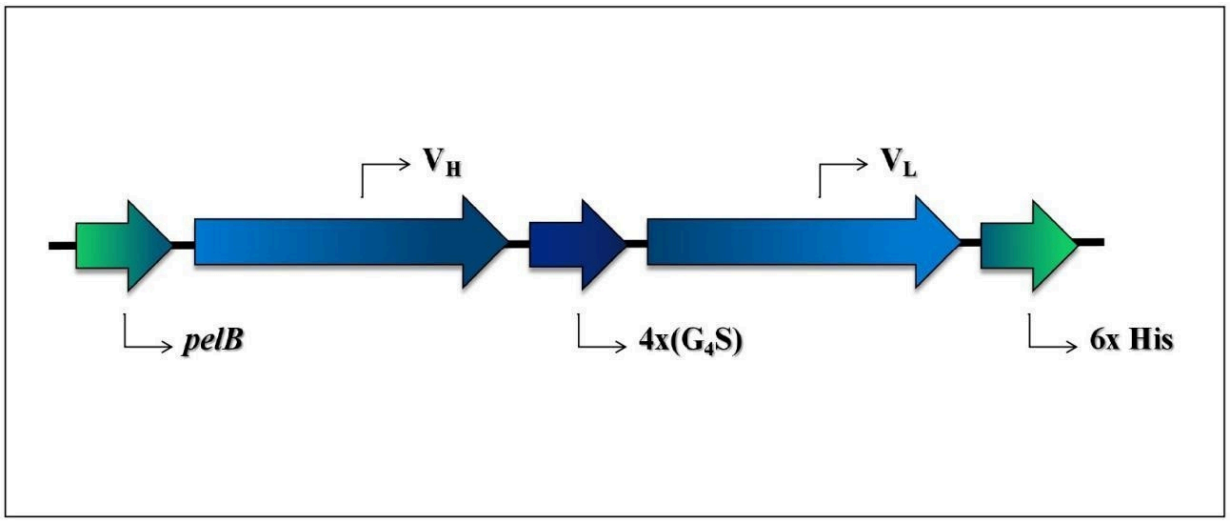
Figura 40 - Mapa do vetor pET27b(+) utilizado na clonagem do gene sintético para a expressão dos anticorpos.



O pET27b(+) é um vetor com aproximadamente 5.4 kb e atua sob o controle do *operon Lac* (*Lac O*), o qual é regulado pela adição de IPTG ao meio, onde este se liga ao repressor *LacI* permitindo a interação do promotor T7 RNA polimerase com o operador, culminando na transcrição do gene em RNA mensageiro e posteriormente na tradução em proteína. Além disso, o vetor conta como marcador de seleção o antibiótico canamicina e o peptídeo sinal *pelB*. **Fonte:** GenScript® (https://is.gd/Vhwrmv)

O vetor escolhido, apresenta resistência ao antibiótico canamicina (KanR) como marcador de seleção e permite a inserção de um peptídeo sinal, denominado *pelB*, na porção N-terminal da proteína alvo, para que a expressão dessa seja direcionada ao espaço periplasmático da célula bacteriana, otimizando a formação de pontes dissulfetos presentes nos domínios do fragmento de anticorpo, devido a presença de chaperonas e dissulfeto isomerases, resultando na melhora do dobramento da proteína. Além disso, este vetor permite a adição da cauda de histidina (His-tag) na porção C-terminal da proteína, a qual facilita a purificação e identificação dessa em ensaios biomoleculares. O desenho esquemático da construção se encontra representado pela figura 41.

Figura 41 - Modelo esquemático geral utilizado na construção do gene sintético para a expressão de ambos anticorpos scFv.



A construção do gene sintético se deu com o emprego do peptídeo sinal na porção N-terminal da estrutura, seguido da inserção de uma alça flexível formada por glicina e serina unindo a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo, finalizando com seis resíduos de histidina para auxiliar na purificação da proteína. **Fonte:** Este trabalho.

Os parâmetros relacionados à massa molecular, ao ponto isoelétrico (pI) e ao valor do coeficiente de absortividade molar (ϵ) característico para cada anticorpo são importantes para o processo de expressão, purificação e quantificação das proteínas, e foram obtidos pela ferramenta *Compute pI/Mw* e ProtParam. Os valores teóricos obtidos para o anticorpo scFv-CR3022 foram 27.9 kDa e pI de 8.28, respectivamente, sendo o esperado para fragmentos dessa natureza, assemelhando-se aos resultados alcançados pelo o anticorpo MAD22, onde esses parâmetros equivalem a 28.4 kDa e pI de 8.93, respectivamente.

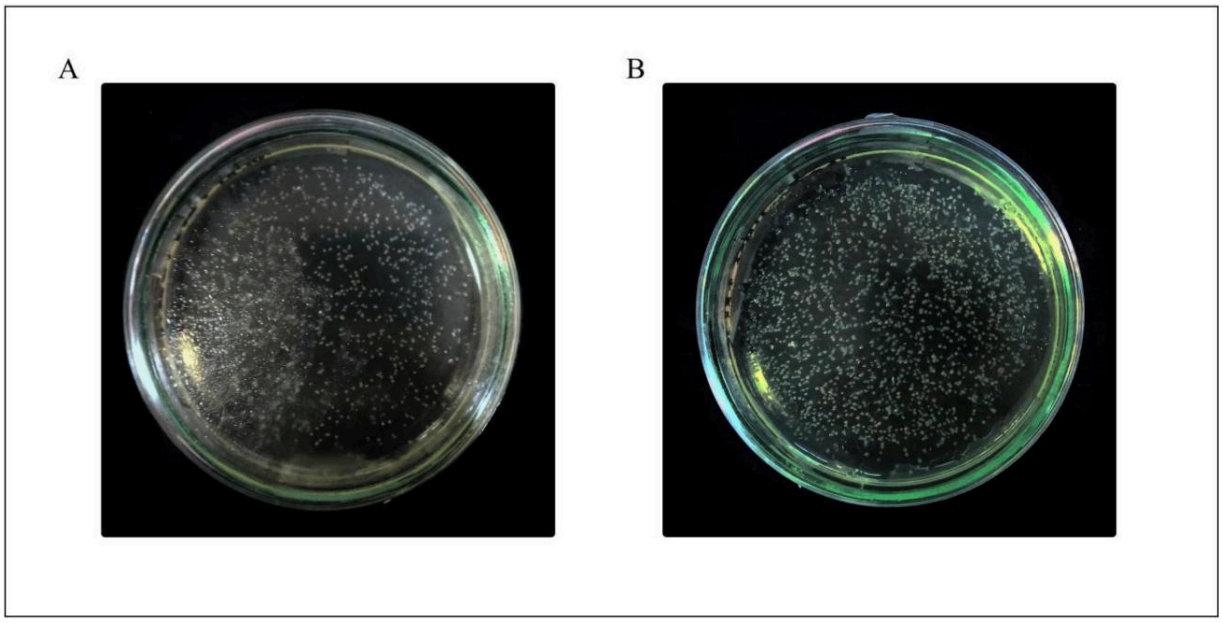
O gene sintético foi clonado em frame no vetor pET27b(+) pela empresa WatsonBio Sciences via FastBio LTDA usando os sítios de restrição *Nde* I e *BamH* I. Os certificados de qualidade das clonagens apresentados pela empresa se encontram disponíveis no ANEXO C. Brevemente, o DNA plasmidial extraído de células competentes de *E. coli* cepa TOP10 (utilizada para amplificação) previamente transformadas com as construções para expressar os anticorpos foram tratados com as enzimas de restrição *Mlu* I e *Kpn* I (para o anticorpo scFv-CR3022) e *Xba* I e *Xho* I (para o anticorpo scFv MAD22) com o objetivo de promover a digestão dos plasmídeos e, em seguida, as amostras foram visualizadas aplicando-as em gel de agarose. Os resultados obtidos confirmaram a clonagem do gene sintético ao vetor por meio do aparecimento de uma banda na altura de 806 bp, referente ao gene, e outra próxima a 5.4 kb, indicando a presença do vetor vazio. As construções também foram confirmadas por sequenciamento pela empresa (dados não mostrados).

Os plasmídeos foram ressuspendidos em 20 µL água ultrapura estéril e, em seguida, utilizados na etapa de transformação da célula de *E. coli* cepa DH5α competente para a amplificação da construção e posterior uso para expressão em *E. coli* BL21DE3.

5.2 TRANSFORMAÇÃO DO GENE SINTÉTICO EM CÉLULAS *E. coli* DH5α COMPETENTES, EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E ANÁLISE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS

A transformação das células competentes DH5α prosseguiu de acordo com a metodologia descrita anteriormente. As colônias contendo o DNA recombinante apareceram após 12 horas de incubação a 37ºC. O crescimento das colônias em meio contendo o antibiótico de seleção infere que o processo de transformação ocorreu de modo satisfatório. As colônias então foram selecionadas e submetidas ao processo de extração do DNA plasmidial. A figura 42 representa os resultados obtidos para as células contendo o gene referente ao anticorpo scFv-CR3022 e para o anticorpo scFv-MAD22.

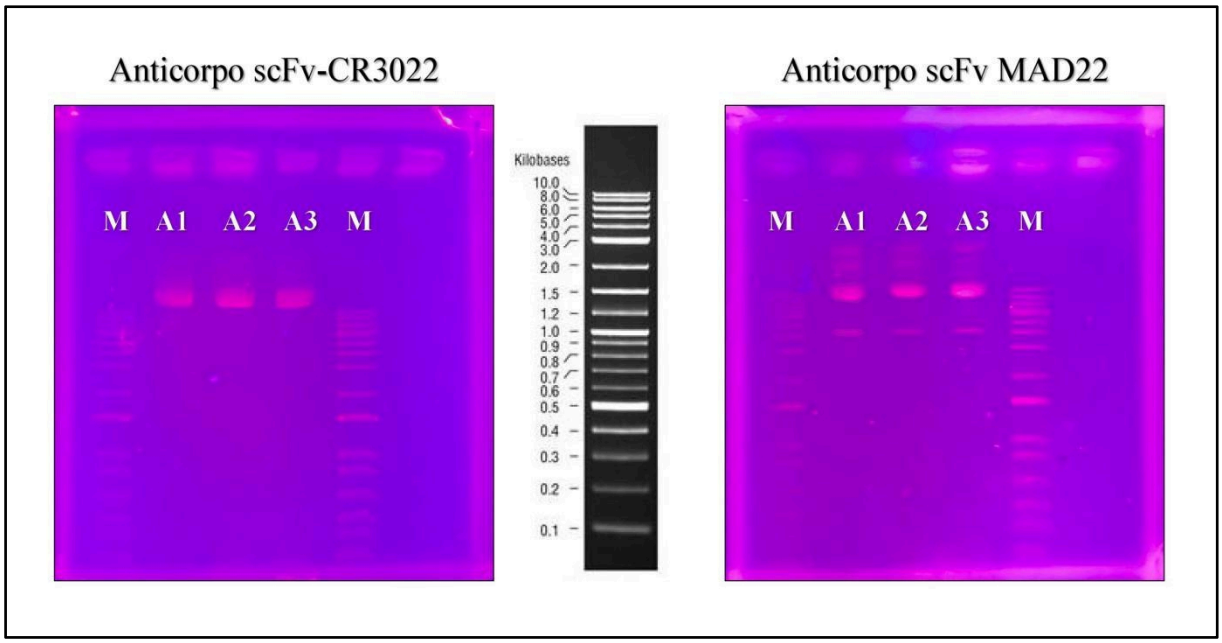
Figura 42 - Placa de petri contendo meio LB canamicina mostrando o processo de seleção dos clones.



(A) Colônias hospedando o gene sintético para a expressão do anticorpo scFv-CR3022. **(B)** Células contendo o DNA recombinante para a expressão do anticorpo scFv MAD22. **Fonte:** Este trabalho.

Como não houve a etapa de lavagem das amostras com fenol-clorofórmio durante os últimos processos da miniprep por lise alcalina e SDS, os resultados obtidos pela quantificação do DNA plasmidial utilizando o NanoDrop™ Thermofischer demonstraram a presença de alto teor de impurezas, indicado por valores da correlação A260/A280 > 2.0, sendo, posteriormente, confirmado pela eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Desse modo, a extração do DNA plasmidial foi realizada novamente, porém, utilizando o kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System*. As bandas referentes ao DNA plasmidial extraídos das células de *E. coli* DH5α transformadas normalmente aparecem acima do marcador de peso molecular (M), de modo que a presença desse no gel atua como o controle positivo de que a corrida da eletroforese ocorreu de maneira desejada. As minipreps então foram utilizadas para transformar células BL21(DE3)-RIL competentes e assim dar início ao processo de expressão dos anticorpos scFv recombinantes. O resultado obtido pode ser visualizado pela figura 43.

Figura 43 - Amostras de DNA plasmidial extraído por meio do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* em gel de agarose 1% (m/v).



As amostras das minipreps foram realizadas em triplicatas (A1, A2 e A3), sendo aplicadas ao gel 3 µL do DNA plasmidial diluído em 2 µL de tampão 6X e 1 µL de H_2O. Essa diluição foi necessária devido a grande concentração obtida para cada amostra. A correlação A260/A280 também ocorreu dentro do esperado, com valores variando entre 1.8 a 2.0, o qual indica alto teor de pureza das amostras, corroborando com o observado no gel de agarose. M: Marcador de peso molecular; A1: Amostra 1; A2: Amostra 2; A3: Amostra 3. **Fonte:** Este trabalho.

5.3 TESTE DE EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS scFv EM CÉLULA DE *E. coli* BL21(DE3)-RIL COMPETENTES

Os testes de expressão dos anticorpos scFv foram realizados em quatro temperaturas diferentes, utilizando como organismo de expressão a cepa de *E. col*i BL21(DE3)-RIL. A metodologia de transformação foi a mesma adotada para as células DH5α e detalhada previamente. A indução ocorreu durante 48 horas sob a rotação fixa de 180 rpm e os resultados obtidos foram visualizados por meio de SDS-PAGE e *Western blotting*.

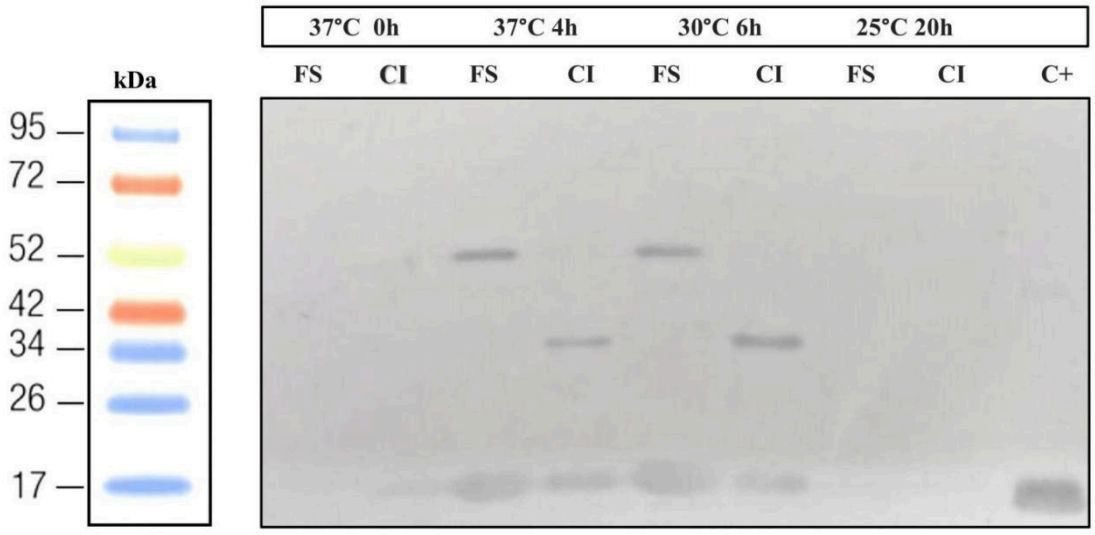
5.3.1 Teste de indução do Anticorpo scFv-CR3022 nas temperaturas de 15ºC, 25ºC, 30ºC e 37ºC

Os testes de indução foram realizados com a adição padrão de IPTG na concentração final de 1,0 mM, sendo o valor máximo recomendado pelo protocolo de Sambrook & Russel (2000). Testes preliminares em temperaturas amenas, como a realizada em 15ºC, não foram possíveis obter expressão da proteína recombinante, mesmo utilizando a cepa de *E. coli* engenheirada ArcticExpress(DE3), ideal para essas condições. A expressão em temperaturas mais baixas auxilia na otimização do dobramento da proteína, evitando a formação de corpos de inclusão insolúveis, de modo a obter um maior rendimento das proteínas na fração solúvel (JIA *et al*., 2016).

Os ensaios executados sob a temperatura de 25ºC não obtiveram resultados promissores. As análises realizadas por SDS-PAGE e *Western blotting* demonstraram que mesmo após um longo período de tempo de indução não foi possível obter a proteína recombinante nem na fração solúvel ou em corpos de inclusão na matriz citoplasmática. Em contrapartida, quando os testes foram submetidos a temperaturas mais elevadas, como 30ºC e 37ºC, foi possível observar bandas de expressão da proteína em períodos reduzidos. Além disso, o aparecimento dessas bandas infere que o tempo de eletrotransferência utilizado foi o suficiente. A figura 44 representa o resultado obtido para os testes de indução referente ao anticorpo scFv-CR3022 utilizando *pellet* de 20 mL.

Devido a quantidade significativa de amostras obtidas, para analisar se houve ou não a expressão da proteína na respectiva temperatura apenas algumas alíquotas foram processadas. A escolha baseou-se nas características adotadas por outras proteínas já produzidas pelo grupo. Desse modo, bandas de expressão foram observadas tanto na fração solúvel quanto no corpo de inclusão, entretanto, localizadas em 3 diferentes massas moleculares relativas próximas aos marcadores de 52, 34 e 17 kDa. É interessante ressaltar que, apesar da massa molecular teórica do anticorpo scFv-CR3022 ser 27.9 kDa, a corrida da molécula durante a eletroforese apresenta comportamento anômalo, não correspondendo ao predito. Além disso, foi observado uma banda de expressão perto da marcação de 52 kDa, sendo indicativo de que essa proteína se oligomeriza, fenômeno comum entre as estruturas scFv.

Figura 44 - *Western blotting* referente ao teste de temperatura de indução realizada para o anticorpo scFv-CR3022.



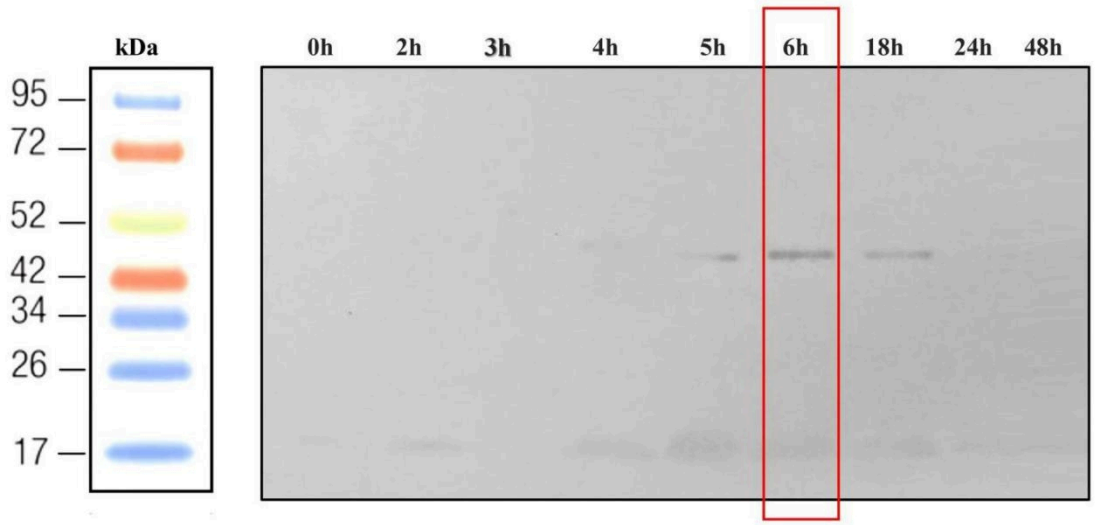
FS: Fração solúvel; CI: Corpo de inclusão. C+: Controle positivo. Marcador *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*. **Fonte:** Este trabalho.

Para maiores detalhes sobre o comportamento da molécula, estudos por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) podem ser realizados. Porém não há dúvida que o scFv em questão foi expresso, uma vez que o mesmo contém a cauda de His carboxi terminal e esta é verificada no *Western blotting*.

5.3.2 Teste de tempo de indução do Anticorpo scFv-CR3022 durante 48h

A etapa de padronização da expressão da proteína prosseguiu-se pela determinação do melhor tempo de indução em que se obtém o anticorpo. Desse modo, apenas as frações solúveis de um *pellet* de 20 mL foram aplicadas ao gel e transferidas para a membrana de nitrocelulose. O procedimento foi realizado para temperaturas de 30ºC e 37ºC. Os resultados demonstrados pela figura 45 se referem às proteínas encontradas na fração solúvel na temperatura de 30ºC durante 48h. Como observado, as bandas de expressão (entre 42 e 52 kDa e próxima de 17 kDa) começaram a aparecer após 4 horas de indução, atingindo concentrações ótimas em 6 horas (canaleta destacada pela caixa vermelha na figura) e apresentando comportamento anormal de padrão de corrida, como relatado previamente.

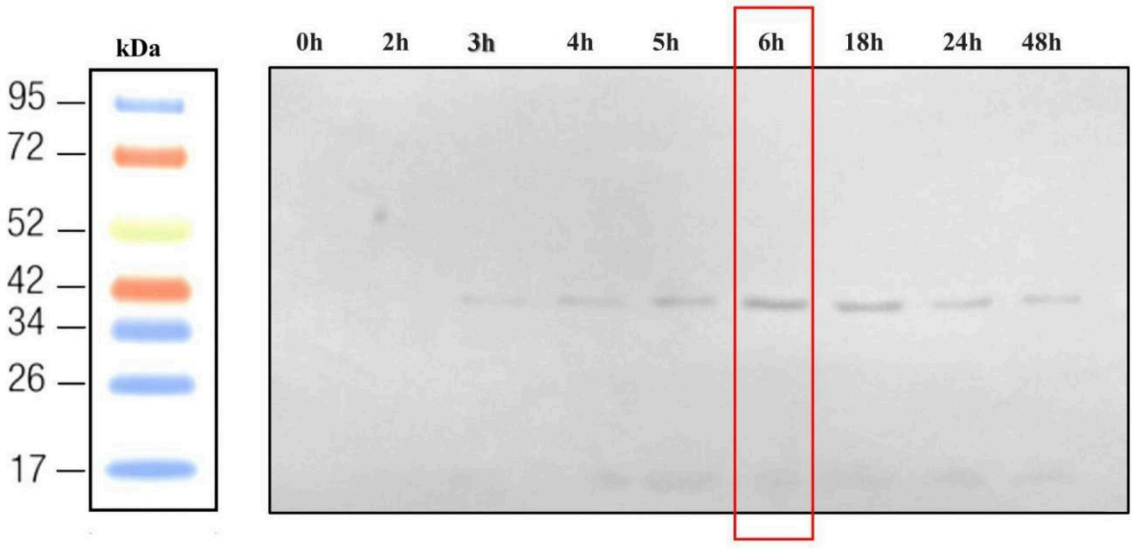
Figura 45 - *Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 recombinante obtidos na fração solúvel a 30ºC durante 48h.



O melhor tempo para expressar o anticorpo scFv-CR3022 sob a temperatura de 30ºC foi determinado como sendo 6 horas de indução (destacado pela caixa vermelha. **Fonte:** Este trabalho.

Os mesmos procedimentos foram realizados para a temperatura de 37ºC (Figura 46). A membrana de *Western blotting* revelou o início da expressão da proteína após 3 horas de indução, permanecendo até 48 horas. Curiosamente, o melhor tempo para a padronização da expressão também ocorreu após 6 horas (banda destacada na caixa vermelha na figura), semelhante ao observado para a temperatura de 30ºC.

Figura 46 - *Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 recombinante obtidos na fração solúvel a 37ºC durante 48h.



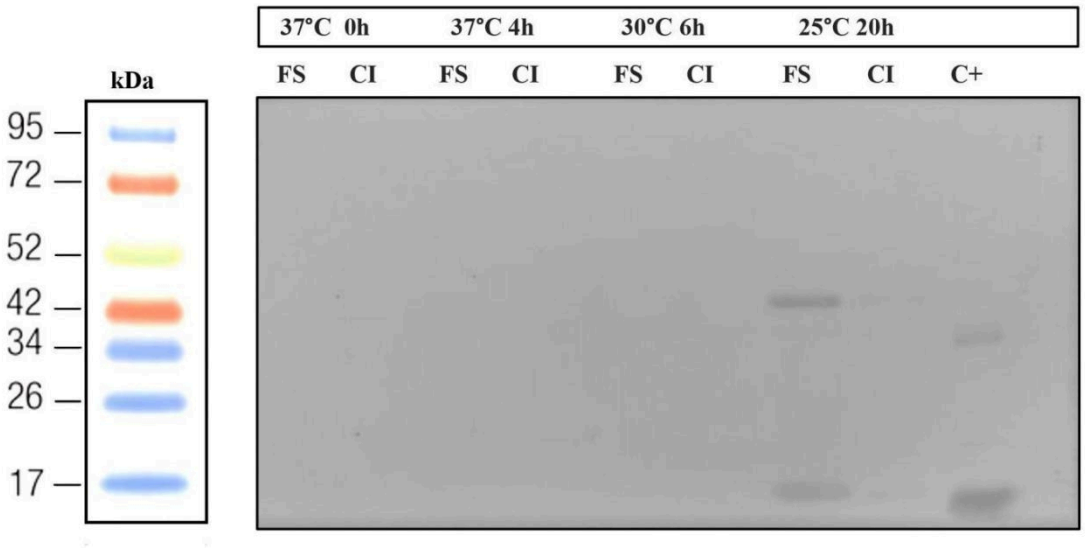
O melhor tempo para expressar o anticorpo scFv-CR3022 sob a temperatura de 37Cº foi determinado como sendo 6 horas de indução (destacado pela caixa vermelha. **Fonte:** Este trabalho.

Dessa forma, os melhores parâmetros para a expressão do anticorpo scFv-CR3022 foram estabelecidos como tempo de indução de 6 horas sob a temperatura de 37ºC. Essa padronização foi posteriormente utilizada para realizar a indução de 1L de cultura para prosseguir com a etapa de purificação da proteína recombinante.

5.3.3 Teste de indução do Anticorpo scFv MAD22 nas temperaturas de 15ºC, 25ºC, 30ºC e 37ºC

A mesma metodologia de indução adotada para o anticorpo scFv-CR3022 foi reproduzida nos testes de expressão do anticorpo scFv-MAD22. Como já observado para a outra proteína, nos testes realizados sob a temperatura de 15ºC não foi possível obter a expressão do anticorpo, de modo que nenhuma banda foi visualizada no gel de poliacrilamida ou marcada na membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western blotting* (dados não mostrados). Ao contrário do observado para o anticorpo scFv-CR3022, também não foi possível obter expressão em temperaturas elevadas como 30ºC e 37ºC, sugerindo que as mutações ocorridas no paratopo do anticorpo também influenciaram na forma em que esse se comporta durante sua produção pelas células de *E. coli*. Em contrapartida, bandas de expressão da proteína recombinante (entre 42 e 52 kDa e próximo a 17 kDa) foram observadas nas alíquotas de indução a 25ºC, perfil não visto nos testes do anticorpo scFv-CR3022 (Figura 47).

Figura 47 - *Western blotting* referente ao teste de temperatura de indução realizada para o anticorpo scFv MAD22.



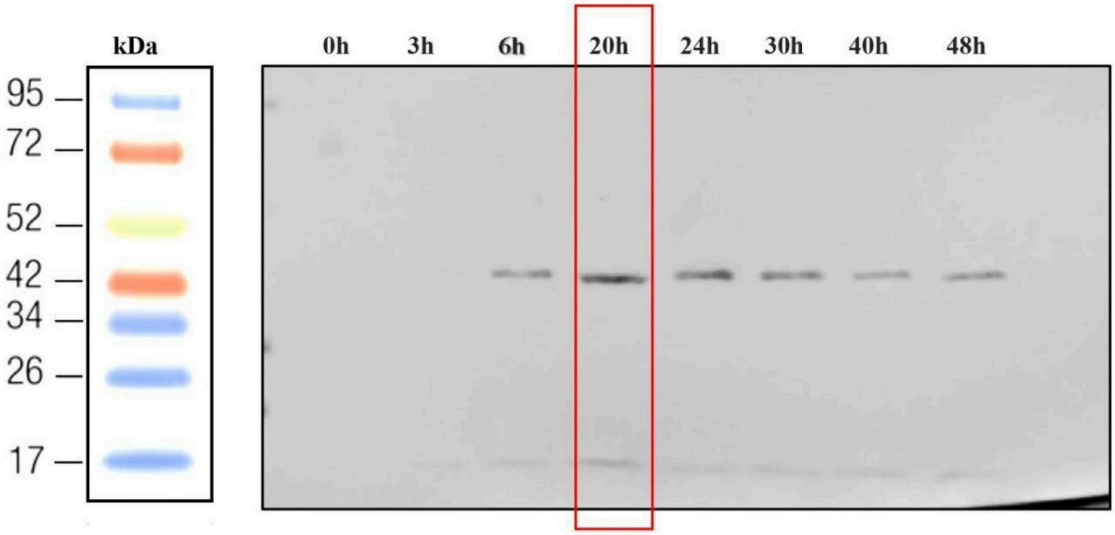
FS: Fração solúvel; CI: Corpo de inclusão; C+: Controle positivo. Marcador *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*. **Fonte:** Este trabalho.

É interessante ressaltar que, apesar da comprovação da expressão, as marcações obtidas pelo *Western blotting* só foram observadas na fração solúvel, diferente do observado nos testes envolvendo o anticorpo scFv-CR3022.

5.3.4 Teste de tempo de indução do Anticorpo scFv MAD22 durante 48h

A padronização do tempo de indução prosseguiu-se pela mesma metodologia previamente descrita, aplicando apenas alíquotas da fração solúvel em um gel de poliacrilamida e, posteriormente, confirmado por meio de *Western blotting*. A figura 48 representa o resultado de *Western blotting* com as bandas de expressão realizadas durante um período de 48h sob a temperatura de 25ºC.

Figura 48 - *Western blotting* contendo alíquotas do anticorpo scFv-MAD22 recombinante obtidos na fração solúvel a 25ºC durante 48h.



O melhor tempo para expressar o anticorpo scFv MAD sob a temperatura de 25ºC foi determinado como sendo 20 horas de indução (destacado pela caixa vermelha. **Fonte:** Este trabalho.

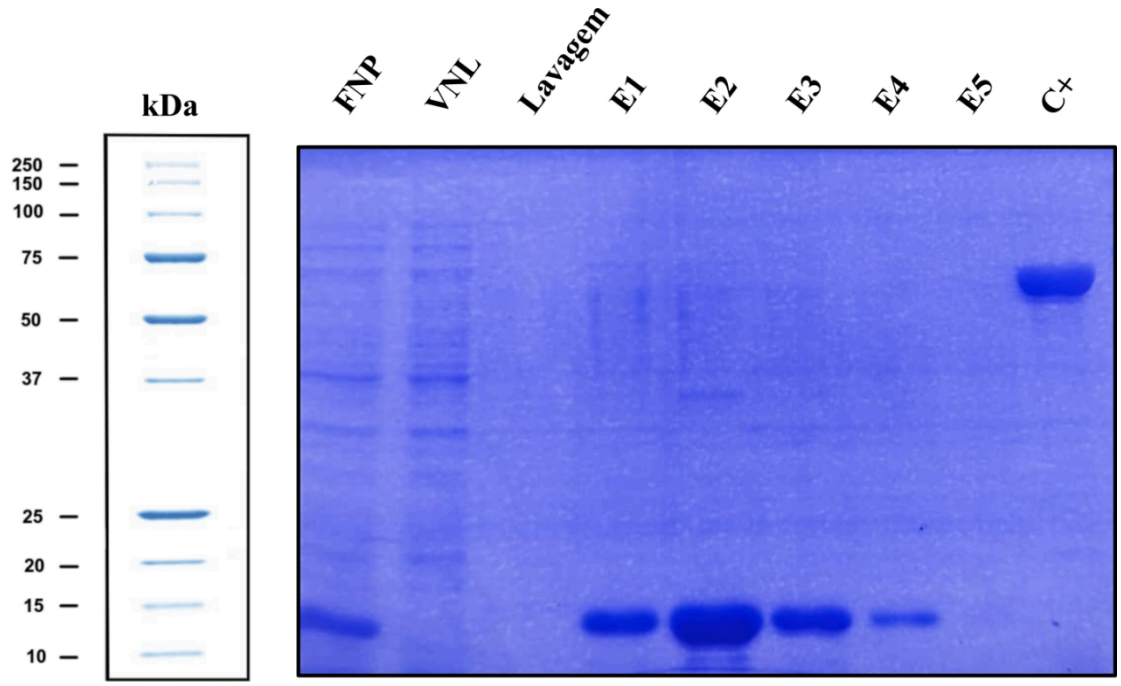
De acordo com os resultados obtidos, das alíquotas selecionadas e processadas, observou-se que a expressão do anticorpo scFv MAD22 teve seu início em períodos tardios, porém, perdurando durante 48 horas. No entanto, no tempo de 20h foi percebido uma marcação mais forte do que o visto para os outros intervalos, sendo então utilizado na padronização da expressão a ser adotado nos testes de purificação.

5.4 PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS scFv-CR3022 e scFv MAD22

O melhor tempo para expressar cada anticorpo recombinante foi padronizado para induzir 1L de cultura a ser utilizada na etapa de purificação das proteínas. O processo foi realizado por meio da técnica de cromatografia por afinidade aplicando a amostra em uma coluna de níquel acoplada a um sistema FPLC. A eluição das proteínas foi feita em uma única etapa, eluindo com 100% de tampão B, e as amostras coletadas foram analizadas por SDS-PAGE.

Os resultados alcançados para o anticorpo scFv-CR3022 demonstrou que a proteína se manteve fortemente aderida na coluna durante sua aplicação no sistema, representado na figura 49 pela ausência de banda na canaleta ocupada pelo volume não ligado, e também durante a etapa de lavagem pelo tampão A contendo 40 mM de imidazol. Esse resultado sugere que o desenho da estrutura empregando a calda de histidina na porção C-terminal pode ter auxiliado em uma melhor interação da proteína com a coluna, uma vez que a porção N-terminal é ocupada pelas regiões CDRs caracterizadas por seis *loops,* os quais refletem em uma maior flexibilidade da região, podendo interferir na ligação dos seis resíduos de histidina com a coluna de níquel. As alíquotas de 1 mL coletadas e nomeadas como E1-5 foram utilizadas para aplicar 15 µL da amostra no gel. A eluição de número 2 foi a que obteve maior concentração de proteína, referente ao ápice do pico visualizado pelo cromatograma, sendo contrastada pela eluição número 5, onde não foi possível visualizar banda contendo a proteína purificada, podendo ser expressa no cromatograma pela fase constante terminal. O cromatograma obtido durante o processo de purificação do anticorpo scFv-CR3022 pode ser consultado no ANEXO D.1.

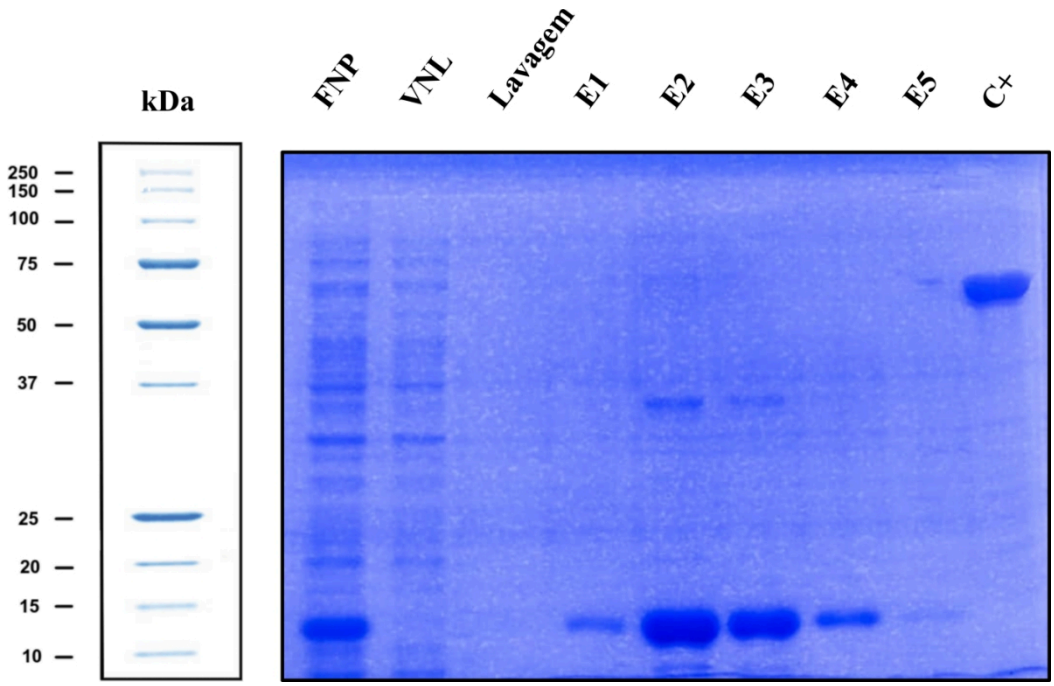
Figura 49 - Gel de poliacrilamida contendo alíquotas do anticorpo scFv-CR3022 obtidas após a purificação da proteína expressa na fração periplasmática da célula bacteriana.



FNP: Fração não purificada; VNL: Volume não ligado; Lavagem; E1: Eluição 1; E2: Eluição 2; E3: Eluição 3; E4: Eluição 4; E5: Eluição 5; C+: Controle positivo. Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards*. **Fonte:** Este trabalho.

A mesma metodologia adotada para purificar o anticorpo recombinante scFv-CR3022 foi empregada na purificação do anticorpo scFv MAD22, e como esperado, o perfil comportamental adotado pela proteína foi o mesmo observado anteriormente (Figura 50). O anticorpo scFv MAD22 também apresentou grande afinidade pela coluna de níquel, se mantendo fortemente ligado durante a aplicação da amostra (volume não ligado) e na lavagem do sistema pelo tampão A, o qual é favorável para obter um maior rendimento da proteína. O perfil de eluição também mostrou-se semelhante, obtendo maior concentração da proteína durante a eluição de número 2, caracterizado pelo ápide do pico no cromatograma (ANEXO D.2). Entretanto, uma marcação discreta apareceu na eluição de número 5, o que não foi visto para o anticorpo scFv-CR3022.

Figura 50 - Gel de poliacrilamida contendo alíquotas do anticorpo scFv MAD22 obtidas após a purificação da proteína expressa na fração periplasmática da célula bacteriana.



FNP: Fração não purificada; VNL: Volume não ligado; Lavagem; E1: Eluição 1; E2: Eluição 2; E3: Eluição 3; E4: Eluição 4; E5: Eluição 5; C+: Controle positivo. Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards*. **Fonte:** Este trabalho.

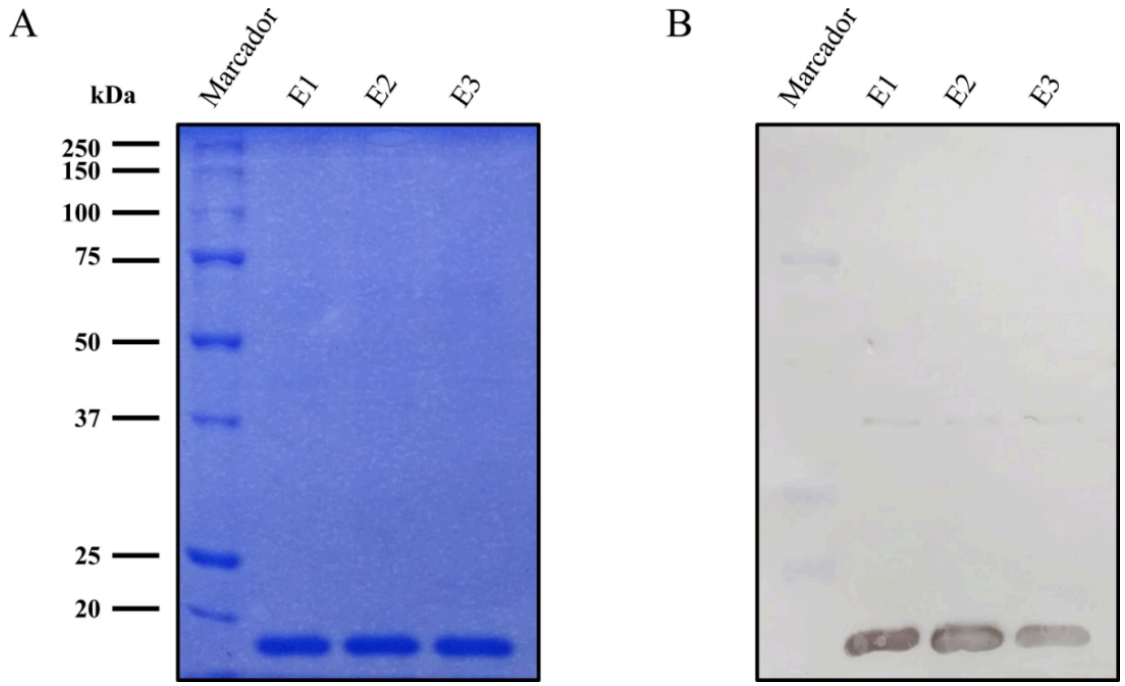
Com base nesses resultados, as alíquotas das três primeiras eluições para cada anticorpo scFv recombinantes foram consideradas nos testes de diálise em tampão carbonato 20 mM em pH 9.6 com o objetivo de remover o teor de imidazol contida nas amostras.

5.5 TESTE DE DIÁLISE E ESTABILIDADE DOS ANTICORPOS scFv EM TAMPÃO CARBONATO 20 mM E CÁLCULO DO RENDIMENTO DAS PROTEÍNAS

O processo de diálise, caracterizada como a última etapa dos ensaios de purificação de proteínas, permite a troca de tampão e remoção de sais presentes nas amostras, de modo que pequenas moléculas atravessam uma membrana semipermeável de diâmetro específico, indo de uma solução mais concentrada para outra menos concentrada, até que ocorra o equilíbrio entre do sistema. Durante esse processo, vários fatores podem levar a preciptação da proteína, como a força iônica, o pH errado da solução, entre outros, os quais são características individuais das proteínas. (PESARRODONA *et al*., 2014).

Para os anticorpos scFv recombinantes, o teste de diálise foi realizado em 200 mL de tampão carbonato a 20 mM e pH 9.6, aplicando as amostras em uma membrana de 33 mm e deixando sob refrigeração durante 24 horas. As amostras se mantiveram estáveis durante todo o processo, não apresentando formação de cristais, o qual é um indicativo para preciptação da proteína. Desse modo, as amostras foram quantificadas e 5 µg de proteína foram aplicadas no gel de policrilamida para uma melhor visualização dos resultados. Pelo *Western blotting* foi possível visualizar formação de marcações discretas um pouco acima do valor de 37 kDa, o que já era previsto e observado durante os testes de expresão da proteína. Não houve nenhuma outra marcação, sugerindo alto teor de pureza das amostras. A figura 51 representa os resultados obtidos para o anticorpo scFv-CR3022.

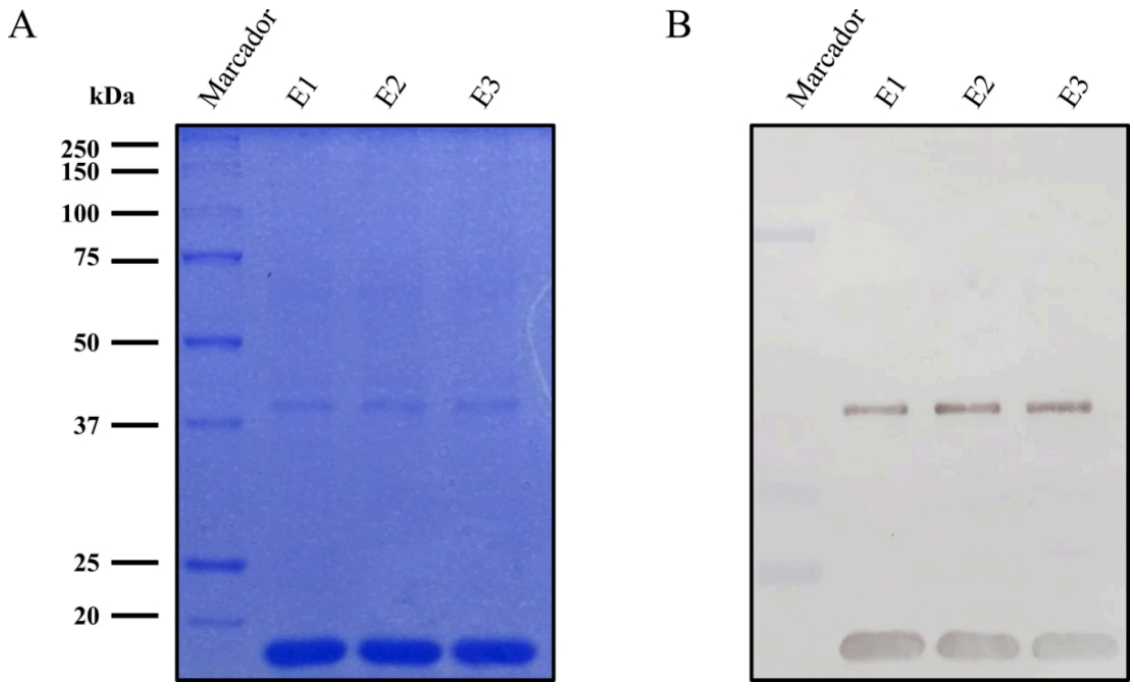
Figura 51 - Alíquotas de anticorpo scFv-CR3022 dialisadas em tampão carbonato pH 9.6.



(A) Gel de policrilamida contendo as três primeiras eluições do anticorpo recombinante scFv-CR3022. **(B)** Confirmação por *Western blotting* da presença da proteína recombinante. E1: Eluição 1; E2: Eluição 2; E3: Eluição 3. **Fonte:** Este trabalho.

O mesmo padrão foi apresentado pelo o anticorpo scFv MAD22, entretanto, a banda referente a proteína oligomerizada obteve uma marcação mais acentuada (Figura 52).

Figura 52 - Alíquotas de anticorpo scFv MAD22 dialisadas em tampão carbonato pH 9.6.

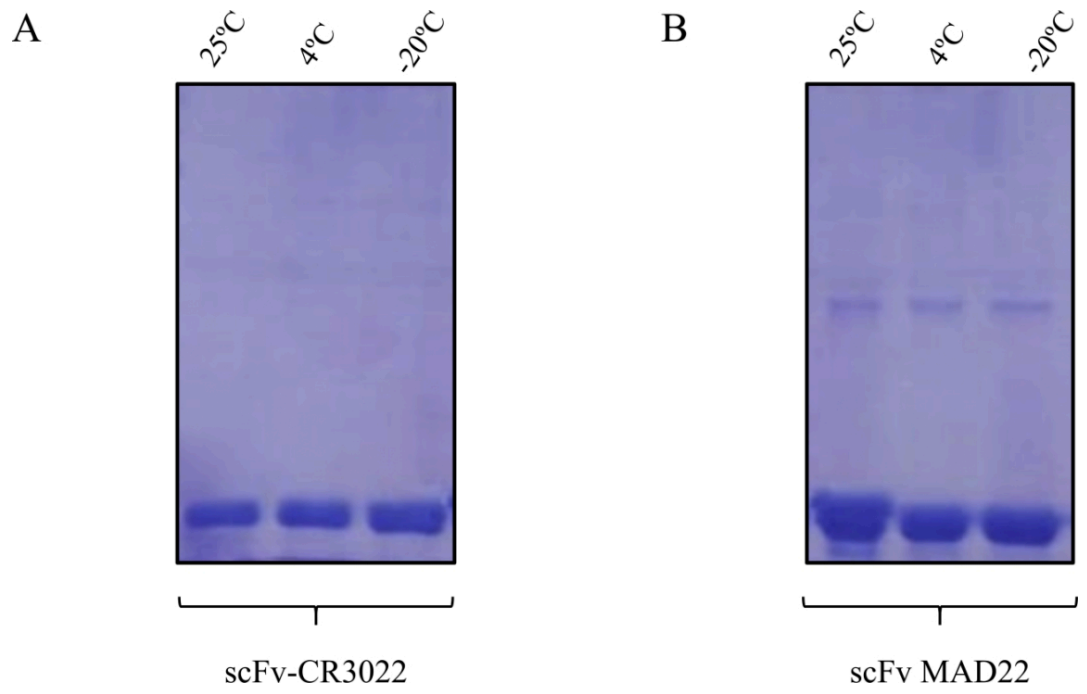


(A) Gel de policrilamida contendo as três primeiras eluições do anticorpo recombinante scFv MAD22. **(B)** Confirmação por *Western blotting* da presença da proteína recombinante. E1: Eluição 1; E2: Eluição 2; E3: Eluição 3. **Fonte:** Este trabalho.

Em seguida, as amostras foram avaliadas quanto sua estabilidade durante um período de 24 horas sendo submetidas a diferentes condições de temperaturas (25ºC, 4ºC e -20ºC). Essa avaliação se faz de suma importância para determinar as melhores condições de armazenaento e transporte das proteínas, assegurando a qualidade do produto. A figura 53a demonstra os resultados obtidos para o anticorpo scFv-CR3022. Como observado, o anticorpo se manteve íntegro quando deixado a 4ºC e a -20ºC, entretanto, a proteína mostrou-se uma leve instabilidade sob temperatura de 25ºC, equivalente a temperatura ambiente, podendo ser representado por um arraste logo abaixo da banda de purificação, caracterizando fragmentos originados pela degradação da proteína. Com base nesses resultados, a temperatura ideal para o armazenamento do anticorpo recombinante foi estabelecido como 4ºC.

As análises realizadas para o anticorpo scFv MAD22 foi semelhado ao alcançado anteriormente, onde a proteína quando submetida a temperatura ambiente apresentou leves degradações (Figura 53b). Assim como observado para o anticorpo scFv-CR3022, a proteína otimizada também obteve boa estabilidade nas outras duas temperaturas avaliadas. sugerindo que a temperatura ideal para seu armazenamento também pode ser feita a 4ªC.

Figura 53 - Teste de estabilidade das proteínas recombinantes em diferentes temperaturas: 25ºC, 4ºC e -20ºC.



(A) Teste de estabilidade referente ao anticorpo recombinante scFv-CR3022. **(B)** Teste de estabilidade referente ao anticorpo recombinante scFv MAD22. **Fonte:** Este trabalho.

O cálculo do rendimento foi realizado com base em 1L de indução. Os resultados obtidos foram satisfatório para ambas proteínas. O rendimento teórico apresentado pelo anticorpo scFv-CR3022 foi de 8,49 mg/L, semelhante ao do anticorpo scFv MAD22, onde esses valores equivaleram a 7,91 mg/L. Um bom rendimento adquirido no processo de obtenção da proteína se torna vantajoso para o escalonamento do produto e aumento do fluxo de produção, podendo ser disponibilizado de forma mais rápido no mercado e por preços mais baixos.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Após o desenvolvimento desse trabalho, alguns aperfeiçoamentos ainda devem ser realizados, como os testes de padronização da concentração de IPTG, cuja o objetivo é alcançar a concentração mínima necessária a ser aplicada durante os experimentos.

A avaliação do reconhecimento de ambos anticorpos frente ao antígeno viral comercial e em amostras de pacientes doentes também devem ser desenvolvidos e padronizados para assegurar a eficiência das mutações *in silico* realizada no paratopo do anticorpo scFv MAD22 quando comparada ao anticorpo scFv-CR3022. Além disso, para compreender melhor essas interações, o estudo da biofísica envolvendo o complexo antígeno-anticorpo deve ser experimentalmente realizado e avaliado.

Efetuar testes de neutralização para ambos anticorpos para avaliar seu emprego como um possível biofármaco no tratamento da COVID-19.

CONCLUSÃO FINAL

Com a execução desse trabalho foi possível concluir que a qualidade de informações a respeito da estruturas e sequências de proteínas disponíveis atualmente em bancos de dados fornecem diretrizes para o estudo e desenho de novas moléculas apresentando características específicas para uma determinada finalidade, como por exemplo, o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal capaz de interagir com maior especificidade a um epítopo de interesse. Além disso, o desenvolvimento de novos processadores e a aprimoração e a robustez de cálculos fornecem ferramentas valiosas capazes de mimetizar sistemas biológicos reais, podendo reduzir custos de produção e tempo de desenvolvimento de um produto.

A produção de proteínas recombinantes por expressão heteróloga utilizando *E. coli* como organismo de expressão é um método vantajoso para obter proteínas otimizadas por ferramentas computacionais, uma vez que o cultivo da bactéria não necessita de reagentes caros, pode ser escalonado e alcança bom rendimento da proteína com alto grau de pureza e estabilidade, como mostrado pelos resultados. Além disso, o emprego de um peptídeo sinal na estrutura da proteína auxilia no seu correto dobramento assegurando, desse modo, a qualidade da estrutura.

A combinação de métodos *in silico* e *in vitro* se mostra promissor no desenvolvimento de novos produtos biotenológicos, em menor tempo de produção e também menor custo do produto final, sendo de suma importância em cenários emergenciais como a pandemia da COVID-19.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 9ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders. 2019. 576p.

ABRAHAM, Mark James; MURTOLA, Teemu; SCHULZ, Roland; PÁLL, Szilárd; SMITH, Jeremy C.; HESS, Berk; LINDAHL, Erik. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Softwarex**, Sweden, v. 1-2, p. 19-25, set. 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352711015000059?via%3Dihub

ADCOCK, Stewart A.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular Dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical Reviews**, California, v. 106, n. 5, p. 1589-1615, 9 fev. 2006. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr040426m

ADOLF-BRYFOGLE, Jared; KALYUZHNIY, Oleks; KUBITZ, Michael; WEITZNER, Brian D.; HU, Xiaozhen; ADACHI, Yumiko; SCHIEF, William R.; DUNBRACK, Roland L.. RosettaAntibodyDesign (RAbD): a general framework for computational antibody design. **Plos Computational Biology**, United States Of America, v. 14, n. 4, p. 1-38, 27 abr. 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881815/

AGUIAR, Rodrigo Barbosa de; SILVA, Tábata de Almeida da; COSTA, Bruno Andrade; MACHADO, Marcelo Ferreira Marcondes; YAMADA, Renata Yoshiko; BRAGGION, Camila; PEREZ, Kátia Regina; MORI, Marcelo Alves Silva; OLIVEIRA, Vitor; MORAES, Jane Zveiter de. Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FGF2 3F12E7 monoclonal antibody. **Scientific Reports**, Brazil, v. 11, n. 1, p. 1-11, 14 jan. 2021. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-020-80746-8

AHMAD, Zuhaida Asra; YEAP, Swee Keong; ALI, Abdul Manaf; HO, Wan Yong; ALITHEEN, Noorjahan Banu Mohamed; HAMID, Muhajir. scFv Antibody: principles and clinical application. **Clinical And Developmental Immunology**, Malaysia, v. 2012, p. 1-15, 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312285/

AITKEN, Alastair; LEARMONTH, Michèle P.. QUANTITATION OF PROTEINS: protein determination by uv absorption. In: WALKER, John M.. **The Protein Protocols Handbook**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2002. Cap. 1. p. 1-1172. (0-89603-940-4).

AMANAT, Fatima; KRAMMER, Florian. SARS-CoV-2 Vaccines: status report. **Immunity**, United States Of America, v. 52, n. 4, p. 583-589, abr. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259480/

ANDERSEN, Kristian G.; RAMBAUT, Andrew; LIPKIN, W. Ian; HOLMES, Edward C.; GARRY, Robert F.. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, United States Of America, v. 26, n. 4, p. 450-452, 17 mar. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9

APRILE, Francesco A.; SORMANNI, Pietro; PODPOLNY, Marina; CHHANGUR, Shianne; NEEDHAM, Lisa-Maria; RUGGERI, Francesco S.; PERNI, Michele; LIMBOCKER, Ryan;

HELLER, Gabriella T.; SNEIDERIS, Tomas. Rational design of a conformation-specific antibody for the quantification of Aβ oligomers. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, United Kingdom, v. 117, n. 24, p. 13509-13518, 3 jun. 2020. Disponveíl em: https://www.pnas.org/content/117/24/13509

ASHOUR, Hossam M.; ELKHATIB, Walid F.; RAHMAN, Md. Masudur; ELSHABRAWY, Hatem A.. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. **Pathogens**, United States Of America, v. 9, n. 3, p. 1-15, 4 mar. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-0817/9/3/186

BASS, J. J.; WILKINSON, D. J.; RANKIN, D.; PHILLIPS, B. E.; SZEWCZYK, N. J.; SMITH, K.; ATHERTON, P. J.. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. **Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports**, Derby, v. 27, n. 1, p. 4-25, 5 jun. 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5138151/

BATES, Adam; POWER, Christine A.. David vs. Goliath: the structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. **Antibodies**, United Kingdom, v. 8, n. 2, p. 1-31, 9 abr. 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4468/8/2/28

BERENDSEN, H.J.C.; SPOEL, D. van Der; VAN DRUNEN, R.. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, The Netherlands, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, set. 1995. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001046559500042E?via%3Dihub

BERNARDI, Rafael C.; MELO, Marcelo C.R.; SCHULTEN, Klaus. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)** - General Subjects, United States Of America, v. 1850, n. 5, p. 872-877, maio 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339458/

BIANCHI, Martina; BENVENUTO, Domenico; GIOVANETTI, Marta; ANGELETTI, Silvia; CICCOZZI, Massimo; PASCARELLA, Stefano. Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: structural differences linked to virus characteristics?. **Biomed Research Internationa**l, Italy, v. 2020, p. 1-6, 30 maio 2020. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/4389089/

BLAžEK, D.; CELER, V.. The production and application of single-chain antibody fragments. **Folia Microbiologic**a, Czechia, v. 48, n. 5, p. 687-698, set. 2003. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/BF02993480

BONOMI, Massimiliano; BRANDUARDI, Davide; BUSSI, Giovanni; CAMILLONI, Carlo; PROVASI, Davide; RAITERI, Paolo; DONADIO, Davide; MARINELLI, Fabrizio; PIETRUCCI, Fabio; BROGLIA, Ricardo A.. PLUMED: a portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. **Computer Physics Communications**, Switzerland, v. 180, n. 10, p. 1961-1972, out. 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001046550900157X

BOWIE, J.; LUTHY, R; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, Los Angeles, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 12 jul. 1991. Disponível em: https://science.sciencemag.org/content/253/5016/164.long

BROOKS, B. R.; BROOKS, C. L.; MACKERELL, A. D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R. J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.. CHARMM: the biomolecular simulation program. **Journal Of Computational Chemistry**, United States Of America, v. 30, n. 10, p. 1545-1614, 14 maio 2009. Disponvíel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810661/

BWIRE, George M.; MAJIGO, Mtebe V.; NJIRO, Belinda J.; MAWAZO, Akili. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: a systematic review and meta ∶analysis. **Journal Of Medical Virology**, Tanzania, v. 93, n. 2, p. 719-725, 2 ago. 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26349
CARUGO, Oliviero; DJINOVIć-CARUGO, Kristina. Half a century of Ramachandran plots. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Italy, v. 69, n. 8, p. 1333-1341, 13 jul. 2013. Disponível em: http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444491301158X

CARUGO, Oliviero; PONGOR, Sándor. A normalized root-mean-spuare distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein Science**, Italy, v. 10, n. 7, p. 1470-1473, 31 dez. 2008. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.690101

CASE, David A.; CHEATHAM, Thomas E.; DARDEN, Tom; GOHLKE, Holger; LUO, Ray; MERZ, Kenneth M.; ONUFRIEV, Alexey; SIMMERLING, Carlos; WANG, Bing; WOODS, Robert J.. The Amber biomolecular simulation programs. Journal Of Computational Chemistry, California, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 7 jan. 2005. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20290

CASSANITI, Irene; NOVAZZI, Federica; GIARDINA, Federica; SALINARO, Francesco; SACHS, Michele; PERLINI, Stefano; BRUNO, Raffaele; MOJOLI, Francesco; BALDANTI, Fausto. Performance of VivaDiag COVID-19 IgM/IgG Rapid Test is inadequate for diagnosis of COVID-19 in acute patients referring to emergency room department. **Journal Of Medical Virology**, Italy, v. 92, n. 10, p. 1724-1727, 8 abr. 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25800

CASSUTO, Nino Guy; GRAVIER, Anne; COLIN, Mathilda; THEILLAY, Aurelie; PIRES-ROTEIRA3, Daniela; PALLAY, Sandra; SERREAU4, | Raphael; HOCQUELOUX, Laurent; PRAZUCK, Thierry. Evaluation of a SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic test as a self-test: Diagnostic performance and usability. **Journal Of Medical Virology**, France, v. 93, n. 13, p. 1-7, 31 jul. 2021. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27249

CATANZARO, Michele; FAGIANI, Francesca; RACCHI, Marco; CORSINI, Emanuela; GOVONI, Stefano; LANNI, Cristina. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. Signal Transduction And Targeted Therapy, Italy, v. 5, n. 1, p. 1-20, 29 maio 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41392-020-0191-1

CHENG, Lian Sheng; LIU, Ai Ping; YANG, Jia Hong; DONG, Yan Qiu; LI, Liang Wei; WANG, Jing; WANG, Chao Chen; LIU, Jing. Construction, expression and characterization of the engineered antibody against tumor surface antigen, p185c-erbB-2. **Cell Research**, China, v. 13, n. 1, p. 35-48, fev. 2003. Disponível em: https://www.nature.com/articles/7290149

CHIBA, Shuntaro; TANABE, Aki; NAKAKIDO, Makoto; OKUNO, Yasushi; TSUMOTO, Kouhei; OHTA, Masateru. Structure-based design and discovery of novel anti-tissue factor antibodies with cooperative double-point mutations, using interaction analysis. **Scientific Reports**, Japan, v. 10, n. 1, p. 1-12, 16 out. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-020-74545-4

CHIU, Mark L.; GOULET, Dennis R.; TEPLYAKOV, Alexey; GILLILAND, Gary L.. Antibody Structure and Function: the basis for engineering therapeutics. **Antibodies**, United States Of America, v. 8, n. 4, p. 1-55, 3 dez. 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4468/8/4/55

COLOVOS, Chris; YEATES, Todd O.. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, Los Angeles, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, set. 1993. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.5560020916

CORNELL, Wendy D.; CIEPLAK, Piotr; BAYLY, Christopher I.; GOULD, Ian R.; MERZ, Kenneth M.; FERGUSON, David M.; SPELLMEYER, David C.; FOX, Thomas; CALDWELL, James W.; KOLLMAN, Peter A.. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **Journal Of The American Chemical Society**, California, v. 117, n. 19, p. 5179-5197, maio 1995. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja00124a002

COUTSIAS, Evangelos A.; WESTER, Michael J.. RMSD and Symmetry. **Journal Of Computational Chemistry**, New York, v. 40, n. 15, p. 1496-1508, 3 mar. 2019. Disponvíel em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.25802

CRIVIANU-GAITA, Victor; THOMPSON, Michael. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. **Biosensors And Bioelectronics**, Canada, v. 85, p. 32-45, nov. 2016. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566316303694?via%3Dihub

CUBUK, Jasmine; ALSTON, Jhullian J.; INCICCO, J. Jeremías; SINGH, Sukrit; STUCHELL-BRERETON, Melissa D.; WARD, Michael D.; ZIMMERMAN, Maxwell I.; VITHANI, Neha; GRIFFITH, Daniel; WAGONER, Jason A.. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. **Biorxiv**, United States Of America, p. 1-41, 18 jun. 2020. Disponível em: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.17.158121v2.full

CUENDET, Michel A.; MICHIELIN, Olivier. Protein-Protein Interaction Investigated by Steered Molecular Dynamics: the tcr-pmhc complex. **Biophysical Journal**, Switzerland, v. 95, n. 8, p. 3575-3590, out. 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18621828/

CUENDET, Michel A.; ZOETE, Vincent; MICHIELIN, Olivier. How T cell receptors interact with peptide-MHCs: a multiple steered molecular dynamics study. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Switzerland, v. 79, n. 11, p. 3007-3024, 30 ago. 2011. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21989928/

DAMM, Kelly L.; CARLSON, Heather A.. Gaussian-Weighted RMSD Superposition of Proteins: a structural comparison for flexible proteins and predicted protein structures. **Biophysical Journal**, Michigan, v. 90, n. 12, p. 4558-4573, jun. 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1471868/

DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: ann log(n) method for ewald sums in large systems. **The Journal Of Chemical Physics**, North Carolina, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 15 jun. 1993. Disponível em: https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.464397

DASARI, Thirupathi; KONDAGARI, Bhargavi; DULAPALLI, Ramasree; ABDELMONSEF, Aboubakr Haredi; MUKKERA, Thirupathi; PADMARAO, Lavanya Souda; MALKHED, Vasavi; VURUPUTURI, Uma. Design of novel lead molecules against RhoG protein as cancer target – a computational study. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, India, v. 35, n. 14, p. 3119-3139, 4 nov. 2016. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2016.1244492?journalCode=tbsd20

D'CRUZ, Roshan J.; CURRIER, Arthur W.; SAMPSON, Valerie B.. Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, United States Of America, v. 8, p. 1-11, 4 jun. 2020. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00468/full

DIAO, Bo; WEN, Kun; ZHANG, Ji; CHEN, Jian; HAN, Chao; CHEN, Yongwen; WANG, Shufeng; DENG, Guohong; ZHOU, Hongwei; WU, Yuzhang. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Clinical Microbiology And Infection**, China, v. 27, n. 2, p. 1-5, fev. 2021. Disponível em: https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(20)30611-X/fulltext

DINIZ, W.J.s.; CANDURI, F.. REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications. **Genetics And Molecular Research**, Brasil, v. 16, n. 1, p. 1-21, 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28301675/

DO, Phuc-Chau; LEE, Eric H.; LE, Ly. Steered Molecular Dynamics Simulation in Rational Drug Design. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, Vietnam, v. 58, n. 8, p. 1473-1482, 5 jul. 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29975531/

DROR, Ron O.; DIRKS, Robert M.; GROSSMAN, J.P.; XU, Huafeng; SHAW, David E.. Biomolecular Simulation: a computational microscope for molecular biology. **Annual Review Of Biophysics**, New York, v. 41, n. 1, p. 429-452, 9 jun. 2012. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biophys-042910-155245

EDWARDS, Caitlin E.; YOUNT, Boyd L.; GRAHAM, Rachel L.; LEIST, Sarah R.; HOU, Yixuan J.; DINNON, Kenneth H.; SIMS, Amy C.; SWANSTROM, Jesica; GULLY, Kendra; SCOBEY, Trevor D.. Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, United States Of America, v. 117, n. 43, p. 26915-26925, 12 out. 2020. Disponível em: https://www.pnas.org/content/117/43/26915

EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U.. [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods In Enzymology**, United States Of

America, p. 396-404, 1997. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687997770228

ENGH, R. A.; HUBER, R.. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. **Acta Crystallographica Section A Foundations Of Crystallography**, Germany., v. 47, n. 4, p. 392-400, 1 jul. 1991. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1107/S0108767391001071

ESTRUCH, B. Casanova. Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. **Neurología (English Edition)**, Spain, v. 28, n. 3, p. 169-178, abr. 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21592627/

FEHR, Anthony R.; CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; PERLMAN, Stanley. Middle East Respiratory Syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus. **Annual Review Of Medicine**, Iowa, v. 68, n. 1, p. 387-399, 14 jan. 2017. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-051215-031152

FIEDLER, Ulrike; PHILLIPS, Julian; ARTSAENKO, Olga; CONRAD, Udo. Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. **Immunotechnology**, Germany, v. 3, n. 3, p. 205-216, out. 1997. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9358273/

FISER, András; DO, Richard Kinh Gian; ŀALI, Andrej. Modeling of loops in protein structures. **Protein Science**, United States Of America, v. 9, n. 9, p. 1753-1773, jan. 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11045621/

FALZONE, Luca; GATTUSO, Giuseppe; TSATSAKIS, Aristidis; SPANDIDOS, Demetrios; LIBRA, Massimo. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). **International Journal Of Molecular Medicine**, England, v. 47, n. 6, p. 1-23, 12 abr. 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043662/

FARAJNIA, Safar; AHMADZADEH, Vahideh; TANOMAND, Asghar; VEISI, Kamal; KHOSROSHAHI, Shiva Ahdi; RAHBARNIA, Leila. Development trends for generation of single-chain antibody fragments. **Immunopharmacology And Immunotoxicology**, Iran, v. 36, n. 5, p. 297-308, ago. 2014. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08923973.2014.945126

FORSTER, Mark J.. Molecular modelling in structural biology. **Micron**, United Kingdom, v. 33, n. 4, p. 365-384, jan. 2002. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096843280100035X

FUNG, Sin-Yee; YUEN, Kit-San; YE, Zi-Wei; CHAN, Chi-Ping; JIN, Dong-Yan. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. **Emerging Microbes & Infections**, Hong Kong, v. 9, n. 1, p. 558-570, 1 jan. 2020. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1736644

GAO, Tianyi; GAO, Yingdong; LIU, Xiangxiang; NIE, Zhenlin; SUN, Huilin; LIN, Kang; PENG, Hongxin; WANG, Shukui. Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. **Bmc Microbiology**, China, v. 21, n. 1, p. 1-10, 22 fev. 2021.

Disponível em: https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-021-02107-3

GEERING, Barbara; FUSSENEGGER, Martin. Synthetic immunology: modulating the human immune system. **Trends In Biotechnology**, Switzerland, v. 33, n. 2, p. 65-79, fev. 2015. Disponível em: https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(14)00213-3

Gew, Adam; GOÑI, Ramón; OROZCO; GELPI, Josep. Modesto. Molecular dynamics simulations: advances and applications. **Advances And Applications In Bioinformatics And Chemistry**, Spain, p. 37-47, nov. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655909/

GHAMGHAMI, Elham; AGHDAM, Marjan Abri; TOHIDKIA, Mohammad Reza; AHMADIKHAH, Asadollah; KHANMOHAMMADI, Morteza; MEHDIPOUR, Tayebeh; MOKHTARZADEH, Ahad; BARADARAN, Behzad. Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES) periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. **Amb Express**, Iran, v. 10, n. 1, p. 1-13, 20 jul. 2020. Disponível em: https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-01063-x

GHEBLAWI, Mahmoud; WANG, Kaiming; VIVEIROS, Anissa; NGUYEN, Quynh; ZHONG, Jiu-Chang; TURNER, Anthony J.; RAIZADA, Mohan K.; GRANT, Maria B.; OUDIT, Gavin Y.. Angiotensin-Converting Enzyme 2: sars-cov-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, Canada, v. 126, n. 10, p. 1456-1474, 8 maio 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32264791/

GOGA, Nicolae; MAYRHOFER, Leonhard; TRANCA, Ionut; NEDEA, Silvia; HEIJMANS, Koen; PONNUCHAMY, Veerapandian; VASILATEANU, Andrei. A Review of Recent Developments in Molecular Dynamics Simulations of the Photoelectrochemical Water Splitting Process. **Catalysts**, Romania, v. 11, n. 7, p. 1-25, 30 jun. 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4344/11/7/807

GOMES, Amitha Reena; BYREGOWDA, Sonnahallipura Munivenkatappa; VEEREGOWDA, Belamaranahally Muniveerappa; BALAMURUGAN, Vinayagamurthy. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances In Animal And Veterinary Sciences**, India, v. 4, n. 7, p. 346-356, jun. 2016. Disponível em: https://rb.gy/ys8kyf

GONZÁLEZ, M.A.. Force fields and molecular dynamics simulations. **École Thématique de La Société Française de La Neutronique**, France, v. 12, p. 169-200, 9 jun. 2011. Disponível em: https://www.neutron-sciences.org/articles/sfn/pdf/2011/01/sfn201112009.pdf

GRUDLEWSKA-BUDA, Katarzyna; WIKTORCZYK-KAPISCHKE, Natalia; WAŁECKA-ZACHARSKA, Ewa; KWIECIńSKA-PIRÓG, Joanna; BUSZKO, Katarzyna; LEIS, Kamil; JUSZCZUK, Klaudia; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, Eugenia; SKOWRON, Krzysztof. SARS-CoV-2—Morphology, Transmission and Diagnosis during Pandemic, Review with Element of Meta-Analysis. **Journal Of Clinical Medicine**, Poland, v. 10, n. 9, p. 1-33, 3 maio 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8125301/

GUO, Yan-Rong; CAO, Qing-Dong; HONG, Zhong-Si; TAN, Yuan-Yang; CHEN, Shou-Deng; JIN, Hong-Jun; TAN, Kai-Sen; WANG, De-Yun; YAN, Yan. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Medical Research**, Singapore, v. 7, n. 1, p. 1-10, 13 mar. 2020. Disponível em: https://mmrjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40779-020-00240-0

GUPTA, Manoj Kumar; VEMULA, Sarojamma; DONDE, Ravindra; GOUDA, Gayatri; BEHERA, Lambodar; VADDE, Ramakrishna. In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, India, v. 39, n. 7, p. 2617-2627, 15 abr. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32238078/

GUVENCH, Olgun; MACKERELL, Alexander D.. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. Methods In Molecular Biology, United States Of America, v. 443, p. 63-88, 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18446282/

HARAPAN, Harapan; ITOH, Naoya; YUFIKA, Amanda; WINARDI, Wira; KEAM, Synat; TE, Haypheng; MEGAWATI, Dewi; HAYATI, Zinatul; WAGNER, Abram L.; MUDATSIR, Mudatsir. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a literature review. **Journal Of Infection And Public Health**, Indonesia, v. 13, n. 5, p. 667-673, maio 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034120304329

HARRACH, Michael F.; DROSSEL, Barbara. Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P, and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity. **The Journal Of Chemical Physics**, Germany, v. 140, n. 17, p. 174501, 7 maio 2014. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811640/

HASHEMZADEH, Pejman; GHORBANZADEH, Vajihe; LASHGARIAN, Hamed Esmaeil; KHEIRANDISH, Farnaz; DARIUSHNEJAD, Hassan. Harnessing Bioinformatic Approaches to Design Novel Multi-epitope Subunit Vaccine Against Leishmania infantum. **International Journal Of Peptide Research And Therapeutics,** Iran, v. 26, n. 3, p. 1417-1428, 17 out. 2019. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-019-09949-6

HASÖKSÜZ, Mustafa; KILIÇ, Selcuk; SARAÇ, Fahriye. Coronaviruses and SARS-COV-2. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, Turkey, v. 50, n. -1, p. 549-556, 21 abr. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293832/

HASSAN, Sk Sarif; CHOUDHURY, Pabitra Pal; ROY, Bidyut. SARS-CoV2 Envelope Protein: non-synonymous mutations and its consequences. **Preprints**, India, p. 1-5, 7 jun. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0888754320307345

HEADEN, Thomas F.; BOEK, Edo S.. Potential of Mean Force Calculation from Molecular Dynamics Simulation of Asphaltene Molecules on a Calcite Surface†. **Energy & Fuels**, United Kingdom, v. 25, n. 2, p. 499-502, 17 fev. 2011. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ef1010385

HESS, Berk; BEKKER, Henk; BERENDSEN, Herman J. C.; FRAAIJE, Johannes G. E. M.. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal Of Computational Chemistry**, The Netherlands, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, set. 1997. Disponível em:

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H

HO, Mitchell; PASTAN, Ira. Display and Selection of scFv Antibodies on HEK-293T Cells. **Methods In Molecular Biology**, United States Of America, p. 99-113, 2009. Disponível em: https://europepmc.org/article/pmc/pmc2790380

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; SCHROEDER, Simon; KRÜGER, Nadine; HERRLER, Tanja; ERICHSEN, Sandra; SCHIERGENS, Tobias S.; HERRLER, Georg; WU, Nai-Huei; NITSCHE, Andreas. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, Germany., v. 181, n. 2, p. 271-280, abr. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302294

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O.. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, United States Of America, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, set. 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30236283/

HOLLINGSWORTH, Scott A.; KARPLUS, P. Andrew. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomolecular Concepts**, Corvallis, v. 1, n. 3-4, p. 271-283, 1 out. 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436958/

HOOD, Leroy; ROWEN, Lee. The human genome project: big science transforms biology and medicine. **Genome Medicine**, United States Of America, v. 5, n. 9, p. 1-8, 2013. Disponível em: https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm483

HSU, Li Yang; CHIA, Po Ying; LIM, Jeremy Fy. The Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Pandemic. **Annals, Academy Of Medicine**, Singapore, v. 49, n. 3, p. 1-3, mar. 2020. Disponível em: https://www.annals.edu.sg/pdf/special/01ED20051_HsuLY_1.pdf

HU, Ben; GUO, Hua; ZHOU, Peng; SHI, Zheng-Li. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, China, v. 19, n. 3, p. 141-154, 6 out. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7

HUANG, Shengjian; JIANG, Changying; ZHANG, Hui; BELL, Taylor; GUO, Hui; LIU, Yang; YAO, Yixin; ZENG, Dongfeng; AHMED, Makhdum; NOMIE, Krystle. The CD20-specific engineered toxin antibody MT-3724 exhibits lethal effects against mantle cell lymphoma. **Blood Cancer Journal**, United States Of America, v. 8, n. 3, p. 1-5, mar. 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5861115/

HULSEWEH, Birgit. Single-chain fragment variable (scFv) with medical potential. **Medical Research And Innovations**, Germany, v. 2, n. 3, p. 1-2, 2018. Disponível em: https://www.oatext.com/single-chain-fragment-variable-scfv-with-medical-potential.php

HWANG, William Ying Khee; FOOTE, Jefferson. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**, Singapore, v. 36, n. 1, p. 3-10, maio 2005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202305000113

INFANTINO, Maria; DAMIANI, Arianna; GOBBI, Francesca Li; GROSSI, Valentina; LARI, Barbara; MACCHIA, Donatella; CASPRINI, Patrizia; VENEZIANI, Francesca; VILLALTA, Danilo; BIZZARO, Nicola; CAPPELLETT, Piero; FABRIS, Martina; QUARTUCCIO, Luca; BENUCCI, Maurizio; MANFREDI, Mariangela. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease:: benefits, limitations and perspectives. **Israel Medical Association Journal**, Italy, v. 22, p. 203-210, abr. 2020. Disponível em: https://www.ima.org.il/MedicineIMAJ/viewarticle.aspx?year=2020&month=04&page=203

ISRALEWITZ, Barry; GAO, Mu; SCHULTEN, Klaus. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. Current Opinion In Structural Biology, Illinois, v. 11, n. 2, p. 224-230, abr. 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11297932/

IYER, Mahalaxmi; JAYARAMAYYA, Kaavya; SUBRAMANIAM, Mohana Devi; LEE, Soo Bin; DAYEM, Ahmed Abdal; CHO, Ssang-Goo; VELLINGIRI, Balachandar. COVID-19: an update on diagnostic and therapeutic approaches. **Bmb Reports**, Coimbatore, v. 53, n. 4, p. 191-205, 30 abr. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7196187/

JAIN, Chakresh Kumar; GUPTA, Money; PRASAD, Yamuna; WADHWA, Gulshan; SHARMA, Sanjeev Kumar. Homology modeling and protein engineering of alkane monooxygenase in Burkholderia thailandensis MSMB121: in silico insights. **Journal Of Molecular Modeling**, India, v. 20, n. 7, p. 1-11, jul. 2014. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00894-014-2340-3

JAYASHREE, Srinivasan; MURUGAVEL, Pavalam; SOWDHAMINI, Ramanathan; SRINIVASAN, Narayanaswamy. Interface residues of transient protein-protein complexes have extensive intra-protein interactions apart from inter-protein interactions. **Biology Direct**, India, v. 14, n. 1, p. 1-14, 15 jan. 2019. Disponível em: https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13062-019-0232-2

JENSEN, Ellen C.. The Basics of Western Blotting. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, New Zealand, v. 295, n. 3, p. 369-371, 3 fev. 2012. Disponível em: https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.22424

JIA, Baolei; JEON, Che Ok. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biology**, Republic Of Korea, v. 6, n. 8, p. 1-17, ago. 2016. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsob.160196

JIN, Yuefei; YANG, Haiyan; JI, Wangquan; WU, Weidong; CHEN, Shuaiyin; ZHANG, Weiguo; DUAN, Guangcai. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, China, v. 12, n. 4, p. 1-17, 27 mar. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/372

JORGENSEN, William L.; TIRADO-RIVES, Julian. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal Of The American Chemical Society**, Indiana, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, 1 mar. 1988. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja00214a001

JOSHI, Soumil Y.; DESHMUKH, Sanket A.. A review of advancements in coarse-grained molecular dynamics simulations. **Molecular Simulation**, United States Of America, v. 47, n.

10-11, p. 786-803, 11 out. 2020. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927022.2020.1828583

KANG, Tae Hyun; SEONG, Baik Lin. Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms. **Frontiers In Microbiology**, Korea, v. 11, p. 1-10, 25 set. 2020b. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01927/full

KANG, Sisi; YANG, Mei; HONG, Zhongsi; ZHANG, Liping; HUANG, Zhaoxia; CHEN, Xiaoxue; HE, Suhua; ZHOU, Ziliang; ZHOU, Zhechong; CHEN, Qiuyue. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, China, v. 10, n. 7, p. 1228-1238, jul. 2020a. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383520305505

KARAMI, Yasaman; GUYON, Frédéric; VRIES, Sjoerd de; TUFFÉRY, Pierre. DaReUS-Loop: accurate loop modeling using fragments from remote or unrelated proteins. **Scientific Reports**, France, v. 8, n. 1, p. 1-12, 12 set. 2018. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-018-32079-w

KARWA, Rakhi; A WARGO, Kurt. Efungumab: a novel agent in the treatment of invasive candidiasis. **Annals Of Pharmacotherapy**, United States Of America, v. 43, n. 11, p. 1818-1823, 22 set. 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19773528/

KASTRITIS, Panagiotis L.; MOAL, Iain H.; HWANG, Howook; WENG, Zhiping; BATES, Paul A.; BONVIN, Alexandre M. J. J.; JANIN, Joël. A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. **Protein Science**, Netherlands, v. 20, n. 3, p. 482-491, 16 fev. 2011. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.580

KASTRITIS, Panagiotis L.; RODRIGUES, João P.G.L.M.; FOLKERS, Gert E.; BOELENS, Rolf; BONVIN, Alexandre M.J.J.. Proteins Feel More Than They See: fine-tuning of binding affinity by properties of the non-interacting surface. **Journal Of Molecular Biology**, Netherlands, v. 426, n. 14, p. 2632-2652, jul. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283614002010

KAUR, Jashandeep; KUMAR, Arbind; KAUR, Jagdeep. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: roadblocks and reinforcements. **International Journal Of Biological Macromolecules**, India, v. 106, p. 803-822, jan. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017323826

KEVADIYA, Bhavesh D.; MACHHI, Jatin; HERSKOVITZ, Jonathan; OLEYNIKOV, Maxim D.; BLOMBERG, Wilson R.; BAJWA, Neha; SONI, Dhruvkumar; DAS, Srijanee; HASAN, Mahmudul; PATEL, Milankumar. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature Materials**, United States Of America, v. 20, n. 5, p. 593-605, 15 fev. 2021. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41563-020-00906-z

KHAN, Fahim Halim. Antibodies and their applications. **Animal Biotechnology**, India, p. 503-522, 2020a. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128117101000239

KHAN, Z.; GHAFOOR, D.; KHAN, A.; UALIYEVA, D.; KHAN, S.A.; BILAL, H.; KHAN, B.; KHAN, A.; SAJJAD, W.. Diagnostic approaches and potential therapeutic options for coronavirus disease 2019. **New Microbes And New Infections**, China, v. 38, p. 1-15, nov. 2020b. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33014380/

KLINT, Julie K.; SENFF, Sebastian; SAEZ, Natalie J.; SESHADRI, Radha; LAU, Ho Yee; BENDE, Niraj S.; UNDHEIM, Eivind A. B.; RASH, Lachlan D.; MOBLI, Mehdi; KING, Glenn F.. Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis via Expression in the Periplasm of E. coli. **Plos One**, Australia, v. 8, n. 5, p. 1-12, 7 maio 2013. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063865

KOMANDURI, R; RAFF, L M. A review on the molecular dynamics simulation of machining at the atomic scale. **Proceedings Of The Institution Of Mechanical Engineers**, Part B: Journal of Engineering Manufacture, United States Of America, v. 215, n. 12, p. 1639-1672, 1 dez. 2001. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/095440540121501201

KOWALSKI, Mark; GUINDON, Jacinthe; BRAZAS, Louise; MOORE, Celine; ENTWISTLE, Joycelyn; CIZEAU, Jeannick; JEWETT, Michael A.s.; MACDONALD, Glen C.. A Phase II Study of Oportuzumab Monatox: an immunotoxin therapy for patients with noninvasive urothelial carcinoma in situ previously treated with bacillus calmette-guérin. **Journal Of Urology**, Ontario, v. 188, n. 5, p. 1712-1718, nov. 2012. Disponível em: https://www.auajournals.org/doi/10.1016/j.juro.2012.07.020

KRAJEWSKI, Rafał; GOłęBIOWSKA, Justyna; MAKUCH, Sebastian; MAZUR, Grzegorz; AGRAWAL, Siddarth. Update on serologic testing in COVID–19. **Clinica Chimica Acta**, Poland, v. 510, p. 746-750, nov. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7491380/

KRIEGER, Elmar; JOO, Keehyoung; LEE, Jinwoo; LEE, Jooyoung; RAMAN, Srivatsan; THOMPSON, James; TYKA, Mike; BAKER, David; KARPLUS, Kevin. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in casp8. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Netherlands, v. 77, n. 9, p. 114-122, 16 ago. 2009. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.22570

KRIEGER, Elmar; NABUURS, Sander B.; VRIEND, Gert. HOMOLOGY MODELING. In: BOURNE, Philip E.; WEISSIG, Helge. **Structural Bioinformatics**. United States Of America: John Wiley & Sons, 2003. Cap. 25, p. 681. (0-471-20200-2). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12647402/

KUMAR, Swatantra; NYODU, Rajni; MAURYA, Vimal K.; SAXENA, Shailendra K.. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control**, India, p. 23-31, 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189391/

KUMAR, Neeraj; SOOD, Damini; TOMAR, Ravi; CHANDRA, Ramesh. Antimicrobial Peptide Designing and Optimization Employing Large-Scale Flexibility Analysis of Protein-

Peptide Fragments. **Acs Omega**, India, v. 4, n. 25, p. 21370-21380, 3 dez. 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31867532/

KUFAREVA, Irina; ABAGYAN, Ruben. Methods of Protein Structure Comparison. **Methods In Molecular Biology**, United States Of America, p. 231-257, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321859/

KUHLMAN, Brian; BRADLEY, Philip. Advances in protein structure prediction and design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, United States Of America, v. 20, n. 11, p. 681-697, 15 ago. 2019. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41580-019-0163-x

KURODA, Daisuke; TSUMOTO, Kouhei. Engineering Stability, Viscosity, and Immunogenicity of Antibodies by Computational Design. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Japan, v. 109, n. 5, p. 1631-1651, maio 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354920300162

LAKHLILI, Wiame; CHEVÉ, Gwénaël; YASRI, Abdelaziz; IBRAHIMI, Azeddine. Determination and validation of mTOR kinase-domain 3D structure by homology modeling. **Oncotargets And Therapy**, France, p. 1923-1930, jul. 2015. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26257525/

LAN, Jun; GE, Jiwan; YU, Jinfang; SHAN, Sisi; ZHOU, Huan; FAN, Shilong; ZHANG, Qi; SHI, Xuanling; WANG, Qisheng; ZHANG, Linqi. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, China, v. 581, n. 7807, p. 215-220, 30 mar. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5

LAPIDOTH, Gideon D.; BARAN, Dror; PSZOLLA, Gabriele M.; NORN, Christoffer; ALON, Assaf; TYKA, Michael D.; FLEISHMAN, Sarel J.. AbDesign: an algorithm for combinatorial backbone design guided by natural conformations and sequences. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Israel, v. 83, n. 8, p. 1385-1406, 6 jun. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881815/

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M.. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Of Applied Crystallography**, England, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1 abr. 1993. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1107/S0021889892009944

LAZIM, Raudah; SUH, Donghyuk; CHOI, Sun. Advances in Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling Methods for the Study of Protein Systems. **International Journal Of Molecular Sciences**, Korea, v. 21, n. 17, p. 6339, 1 set. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6339

LI, Tong; PANTAZES, Robert J.; MARANAS, Costas D.. OptMAVEn – A New Framework for the de novo Design of Antibody Variable Region Models Targeting Specific Antigen Epitopes. **Plos One**, United States Of America, v. 9, n. 8, p. 1-17, 25 ago. 2014. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105954

LI, Zhengtu; YI, Yongxiang; LUO, Xiaomei; XIONG, Nian; LIU, Yang; LI, Shaoqiang; SUN, Ruilin; WANG, Yanqun; HU, Bicheng; CHEN, Wei. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. **Journal Of**

Medical Virology, China, v. 92, n. 9, p. 1518-1524, 13 abr. 2020. Disponível em; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7228300/

LIU, Jia; ZHENG, Xin; TONG, Qiaoxia; LI, Wei; WANG, Baoju; SUTTER, Kathrin; TRILLING, Mirko; LU, Mengji; DITTMER, Ulf; YANG, Dongliang. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. **Journal Of Medical Virology**, China, v. 92, n. 5, p. 491-494, 21 fev. 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25709

LIU, Justin K.H.. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. **Annals Of Medicine And Surgery**, United Kingdom, v. 3, n. 4, p. 113-116, dez. 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2049080114000624

LOBUGLIO, A. F.; WHEELER, R. H.; TRANG, J.; HAYNES, A.; ROGERS, K.; HARVEY, E. B.; SUN, L.; GHRAYEB, J.; KHAZAELI, M. B.. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, United Kingdom, v. 86, n. 11, p. 4220-4224, 1 jun. 1989. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC287422/

LONG, Chunqin; XU, Huaxiang; SHEN, Qinglin; ZHANG, Xianghai; FAN, Bing; WANG, Chuanhong; ZENG, Bingliang; LI, Zicong; LI, Xiaofen; LI, Honglu. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rrt-pcr or ct?. **European Journal Of Radiology**, China, v. 126, p. 1-6, maio 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32229322/

LONGATTI, Andrea; SCHINDLER, Christina; COLLINSON, Andie; JENKINSON, Lesley; MATTHEWS, Carl; FITZPATRICK, Laura; BLUNDY, Margaret; MINTER, Ralph; VAUGHAN, Tristan; SHAW, Michael. High affinity single-chain variable fragments are specific and versatile targeting motifs for extracellular vesicles. **Nanoscale**, United Kingdom, v. 10, n. 29, p. 14230-14244, 2018. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/nr/c8nr03970d

LOVELL, Simon C.; DAVIS, Ian W.; ARENDALL, W. Bryan; BAKKER, Paul I. W. de; WORD, J. Michael; PRISANT, Michael G.; RICHARDSON, Jane S.; RICHARDSON, David C.. Structure validation by Cα geometry: ϵ,ϩ and cβ deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, United Kingdom, v. 50, n. 3, p. 437-450, 8 jan. 2003. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.10286

LUAN, Binquan; HUYNH, Tien. In Silico Antibody Mutagenesis for Optimizing Its Binding to Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **The Journal Of Physical Chemistry Letters**, United States Of America, v. 11, n. 22, p. 9781-9787, 4 nov. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7670821/

LUDWIG, Stephan; ZARBOCK, Alexander. Coronaviruses and SARS-CoV-2: a brief overview. **Anesthesia & Analgesia**, Germany., v. 131, n. 1, p. 93-96, 31 mar. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173023/

LYTRAS, Spyros; XIA, Wei; HUGHES, Joseph; JIANG, Xiaowei; ROBERTSON, David L.. The animal origin of SARS-CoV-2. **Science**, United Kingdom, v. 373, n. 6558, p. 968-970, 17 ago. 2021. Disponível em: https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abh0117

MA, H.; O'KENNEDY, R.. Recombinant antibody fragment production. **Methods**, Ireland, v. 116, p. 23-33, mar. 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202316304492?via%3Dihub

MADEIRA, Fábio; PARK, Young Mi; LEE, Joon; BUSO, Nicola; GUR, Tamer; MADHUSOODANAN, Nandana; BASUTKAR, Prasad; TIVEY, Adrian R N; POTTER, Simon C; FINN, Robert D. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, United Kingdom, v. 47, n. 1, p. 636-641, 12 abr. 2019. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W636/5446251

MAHMOOD, Tahrin; YANG, Ping-Chang. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal Of Medical Sciences**, Canada, v. 4, n. 9, p. 1-6, set. 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/

MAKABE, Koki. Molecular basis of flexible peptide recognition by an antibody. **The Journal Of Biochemistry**, Japan, v. 167, n. 4, p. 343-345, 6 fev. 2020. Disponível em: https://academic.oup.com/jb/article/167/4/343/5728639

MALIK, Yasmin A.. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **The Malaysian Journal Of Pathology**, Malaysia, v. 42, n. 1, p. 3-11, abr. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32342926/

MARIANO, Giuseppina; FARTHING, Rebecca J.; LALE-FARJAT, Shamar L. M.; BERGERON, Julien R. C.. Structural Characterization of SARS-CoV-2: where we are, and where we need to be. **Frontiers In Molecular Biosciences**, United Kingdom, v. 7, p. 1-28, 17 dez. 2020. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.605236/full

MARTÍNEZ-ESPINOSA, Rosa María. Heterologous and Homologous Expression of Proteins from Haloarchaea: denitrification as case of study. **International Journal Of Molecular Sciences**, Spain, v. 21, n. 1, p. 1-14, 20 dez. 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/82

MARTÍ-RENOM, Marc A.; STUART, Ashley C.; FISER, András; SÁNCHEZ, Roberto; MELO, Francisco; ḷALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. **Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure**, New York, v. 29, n. 1, p. 291-325, jun. 2000. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biophys.29.1.291

MATSUYAMA, Shutoku; NAO, Naganori; SHIRATO, Kazuya; KAWASE, Miyuki; SAITO, Shinji; TAKAYAMA, Ikuyo; NAGATA, Noriyo; SEKIZUKA, Tsuyoshi; KATOH, Hiroshi; KATO, Fumihiro. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Japan, v. 117, n. 13, p. 7001-7003, 12 mar. 2020. Disponível em: https://www.pnas.org/content/117/13/7001

MAVROMOUSTAKOS, T.; DURDAGI, S.; KOUKOULITSA, C.; SIMCIC, M.; PAPADOPOULOS, M. G.; HODOSCEK, M.; GRDADOLNIK, S. Golic. Strategies in the Rational Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, Greece, v. 18, n. 17, p. 2517-2530, 1 jun. 2011. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21568895/

MCGIBBON, Robert T.; HUSIC, Brooke E.; PANDE, Vijay S.. Identification of simple reaction coordinates from complex dynamics. **The Journal Of Chemical Physics**, United States Of America, v. 146, n. 4, p. 1-15, 28 jan. 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5272828/

MEO, S.A.; ALHOWIKAN, A.M.; AL-KHLAIWI, T.; MEO, I.M.; HALEPOTO, D.M.; IQBAL, M.; USMANI, A.M.; HAJJAR, W.; AHMED, N.. Novel coronavirus 2019-nCoV: prevalence, biological and clinical characteristics comparison with sars-cov and mers-cov. **European Review For Medical And Pharmacological Sciences**, Saudi Arabia, v. 24, n. 4, p. 2012-2019, fev. 2020. Disponível em: https://www.europeanreview.org/article/20379

MERTENS, Pascal; VOS, Nathalie de; MARTINY, Delphine; JASSOY, Christian; MIRAZIMI, Ali; CUYPERS, Lize; WIJNGAERT, Sigi van Den; MONTEIL, Vanessa; MELIN, Pierrette; STOFFELS, Karolien. Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. **Frontiers In Medicine**, Belgium, v. 7, p. 1-11, 8 maio 2020. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00225/full

PAVLOPOULO, Athanasia; MICHALOPOULOS, Ioannis. State-of-the-art bioinformatics protein structure prediction tools (Review). **International Journal Of Molecular Medicine**, Greece, v. 3, n. 28, p. 295-310, 23 maio 2011. Disponível em: https://www.spandidos-publications.com/ijmm/28/3/295

MILLER, Keith D.; WEAVER-FELDHAUS, Jane; GRAY, Sean A.; SIEGEL, Robert W.; FELDHAUS, Michael J.. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, and Escherichia coli. **Protein Expression And Purification**, United States Of America, v. 42, n. 2, p. 255-267, ago. 2005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S104659280500152X

MIURA, John T; ZAGER, Jonathan s. Neo-DREAM study investigating Daromun for the treatment of clinical stage IIIB/C melanoma. **Future Oncology**, United States Of America, v. 15, n. 32, p. 3665-3674, nov. 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31538818/

MONNIER, Philippe; VIGOUROUX, Robin; TASSEW, Nardos. In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. **Antibodies**, Canada, v. 2, n. 4, p. 193-208, 11 abr. 2013. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4468/2/2/193/htm#

MORRIS, Anne Louise; MACARTHUR, Malcolm W.; HUTCHINSON, E. Gail; THORNTON, Janet M.. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, England, v. 12, n. 4, p. 345-364, abr. 1992. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.340120407

MORRISON, S. L.; JOHNSON, M. J.; HERZENBERG, L. A.; OI, V. T.. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains..

Proceedings Of The National Academy Of Sciences, United States Of America, v. 81, n. 21, p. 6851-6855, 1 nov. 1984. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392030/

MOURA, Diogo Turiani Hourneaux de; MCCARTY, Thomas R.; RIBEIRO, Igor Braga; FUNARI, Mateus Pereira; OLIVEIRA, Pedro Victor Aniz Gomes de; MIRANDA NETO, Antonio Afonso de; MONTE JÚNIOR, Epifânio Silvino do; TUSTUMI, Francisco; BERNARDO, Wanderley Marques; MOURA, Eduardo Guimarães Hourneaux de. Diagnostic Characteristics of Serological-Based COVID-19 Testing: a systematic review and meta-analysis. **Clinics**, Brasil, v. 75, p. 1-11, 2020. Disponível em: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1133408

MUNSTER, Pamela; KROP, Ian E.; LORUSSO, Patricia; MA, Cynthia; SIEGEL, Barry A.; SHIELDS, Anthony F.; MOLNÁR, István; WICKHAM, Thomas J.; REYNOLDS, Joseph; CAMPBELL, Karen. Safety and pharmacokinetics of MM-302, a HER2-targeted antibody–liposomal doxorubicin conjugate, in patients with advanced HER2-positive breast cancer: a phase 1 dose-escalation study. **British Journal Of Cancer**, United States Of America, v. 119, n. 9, p. 1086-1093, out. 2018. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41416-018-0235-2

MUSTAFA, Mujahed I.. Antibodies Engineering by Computational Approach. **Preprints**, Sudan, p. 1-11, 28 jun. 2020. Disponível em: https://www.preprints.org/manuscript/202006.0350/v1

NAGARAJAN, Santhosh Kumar; MADHAVAN, Thirumurthy. Binding Interaction Analysis of Neuromedin U Receptor 1 with the Native Protein Neuromedin U. **Journal Of The Chosun Natural Science**, India, v. 10, n. 1, p. 14-19, 30 mar. 2017. Disponível em: http://koreascience.or.kr/article/JAKO201713647762635.page

NELSON, Aaron L.. Antibody fragments. **Mabs**, United States Of America, v. 2, n. 1, p. 77-83, jan. 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2828581/

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição. Rio Grande do Sul, Artmed, 2014. 1250 p.

NEWSOME, Barrett W.; ERNSTOFF, Marc S.. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? **British Journal Of Clinical Pharmacology**, United States Of America, v. 66, n. 1, p. 6-19, jul. 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2485255/

NGUYEN, Minh N; PRADHAN, Mohan R; VERMA, Chandra; ZHONG, Pingyu. The interfacial character of antibody paratopes: analysis of antibody-antigen structures. **Bioinformatics**, Singapore, v. 33, n. 19, p. 2971-2976, 15 jun. 2017. Disponível em: https://academic.oup.com/bioinformatics/article/33/19/2971/3868505

NGUYEN, Quan Dong; DAS, Arup; DO, Diana V.; DUGEL, Pravin U.; GOMES, Andre; HOLZ, Frank G.; KOH, Adrian; PAN, Carolyn K.; SEPAH, Yasir J.; PATEL, Nikhil. Brolucizumab: evolution through preclinical and clinical studies and the implications for the management of neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, California, v.

127, n. 7, p. 963-976, jul. 2020. Disponível em: https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(20)30041-5/fulltext

NICHOLSON, Lindsay B.. The immune system. **Essays In Biochemistry**, United Kingdom, v. 60, n. 3, p. 275-301, 26 out. 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091071/

NOH, Sang Young; NOTMAN, Rebecca. Comparison of umbrella sampling and steered molecular dynamics methods for computing free energy profiles of aromatic substrates through phospholipid bilayers. **The Journal Of Chemical Physics**, United Kingdom, v. 153, n. 3, p. 01-14, 21 jul. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32716163/

NORMAN, Richard A.; AMBROSETTI, Francesco; BONVIN, Alexandre M J J; COLWELL, Lucy J; KELM, Sebastian; KUMAR, Sandeep; KRAWCZYK, Konrad. Computational approaches to therapeutic antibody design: established methods and emerging trends. Briefings In Bioinformatics, United States Of America, v. 21, n. 5, p. 1549-1567, 18 out. 2019. Disponível em: https://academic.oup.com/bib/article/21/5/1549/5581643

NOWAKOWSKI, Andrew B.; WOBIG, William J.; PETERING, David H.. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. **Metallomics**, Milwauke, v. 6, n. 5, p. 1068-1078, maio 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517606/pdf/nihms-585772.pdf

OOSTENBRINK, Chris; VILLA, Alessandra; MARK, Alan E.; VAN GUNSTEREN, Wilfred F.. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. **Journal Of Computational Chemistry**, Switzerland, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 11 mar. 2004. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20090

ORTIZ-PRADO, Esteban; SIMBAÑA-RIVERA, Katherine; BARRENO, Lenin Gómez-; RUBIO-NEIRA, Mario; GUAMAN, Linda P.; KYRIAKIDIS, Nikolaos C; MUSLIN, Claire; JARAMILLO, Ana María Gómez; BARBA-OSTRIA, Carlos; CEVALLOS-ROBALINO, Doménica. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, Ecuador, v. 98, n. 1, p. 1-31, set. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7260568/

OTHMAN, Houcemeddine; BOUSLAMA, Zied; BRANDENBURG, Jean-Tristan; ROCHA, Jorge da; HAMDI, Yosr; GHEDIRA, Kais; SRAIRI-ABID, Najet; HAZELHURST, Scott. Interaction of the spike protein RBD from SARS-CoV-2 with ACE2: similarity with sars-cov, hot-spot analysis and effect of the receptor polymorphism. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Africa, v. 527, n. 3, p. 702-708, jun. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20309360

OU, Xiuyuan; LIU, Yan; LEI, Xiaobo; LI, Pei; MI, Dan; REN, Lili; GUO, Li; GUO, Ruixuan; CHEN, Ting; HU, Jiaxin. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, China, v. 11, n. 1, p. 1-12, 27 mar. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-020-15562-9

PAK, Alexander J; A VOTH, Gregory. Advances in coarse-grained modeling of macromolecular complexes. **Current Opinion In Structural Biology**, United States Of America, v. 52, p. 119-126, out. 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30508766/

PANTAZES, R. J.; MARANAS, C. D.. OptCDR: a general computational method for the design of antibody complementarity determining regions for targeted epitope binding. **Protein Engineering Design And Selection**, United States Of America, v. 23, n. 11, p. 849-858, 16 set. 2010. Disponível em: https://academic.oup.com/peds/article/23/11/849/1581610

PAQUET, Eric; VIKTOR, Herna L.. Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: a computational review. **Biomed Research International**, Canada, v. 2015, p. 1-18, 16 fev. 2015. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/183918/

PARASHER, Anant. COVID-19: current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. **Postgraduate Medical Journal**, India, p. 1-9, 25 set. 2020. Disponível em: https://pmj.bmj.com/content/97/1147/312.long

PATEL, Jagruti; GHATAK, Somsuvra. Pexelizumab and its Role in the Treatment of Myocardial Infarction and in Coronary Artery Bypass Graft Surgery: a review. **Recent Patents On Cardiovascular Drug Discovery**, India, v. 3, n. 2, p. 145-152, 1 jun. 2008. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18537766/

PATEL, Jagdish Suresh; YTREBERG, F. Marty. Fast Calculation of Protein–Protein Binding Free Energies Using Umbrella Sampling with a Coarse-Grained Model. Journal Of Chemical Theory And Computation, United States Of America, v. 14, n. 2, p. 991-997, 16 jan. 2018. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jctc.7b00660

PEELING, Rosanna W; WEDDERBURN, Catherine J; GARCIA, Patricia J; BOERAS, Debrah; FONGWEN, Noah; NKENGASONG, John; SALL, Amadou; TANURI, Amilcar; HEYMANN, David L. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. **The Lancet Infectious Diseases**, United Kingdom, v. 20, n. 9, p. 245-249, set. 2020. Disponível em: https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30517-X/fulltext

PERLMUTTER, Jason D.; DRASLER, William J.; XIE, Wangshen; GAO, Jiali; POPOT, Jean-Luc; SACHS, Jonathan N.. All-Atom and Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations of a Membrane Protein Stabilizing Polymer. **Langmuir**, United States Of America, v. 27, n. 17, p. 10523-10537, 15 ago. 2011. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la202103v

PERVUSHIN, Konstantin; TAN, Edward; PARTHASARATHY, Krupakar; LIN, Xin; JIANG, Feng Li; YU, Dejie; VARARATTANAVECH, Ardcharaporn; SOONG, Tuck Wah; LIU, Ding Xiang; TORRES, Jaume. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. **Plos Pathogens**, Singapore, v. 5, n. 7, p. 1-14, 10 jul. 2009. Disponível em: https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000511

PESARRODONA, Mireia; UNZUETA, Ugutz; VÁZQUEZ, Esther. Dialysis: a characterization method of aggregation tendency. **Methods In Molecular Biology**, Spain, p. 321-330, 16 nov. 2014. Springer New York. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25447873/

PETO, Tim; AFFRON, Dominic; AFROUGH, Babak; AGASU, Anita; AINSWORTH, Mark; ALLANSON, Alison; ALLEN, Katherine; ALLEN, Collette; ARCHER, Lorraine; ASHBRIDGE, Natasha. COVID-19: rapid antigen detection for sars-cov-2 by lateral flow assay. **Eclinicalmedicine**, England, v. 36, p. 100924, jun. 2021. Disponível em: https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(21)00204-2/fulltext

PITMAN, Melissa R.; MENZ, R. Ian. Methods for Protein Homology Modelling. **Applied Mycology And Biotechnology**, Australia, p. 37-59, 2 set. 2006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874533406800055#:~:text=2.4..-,Model%20Production,(Fiser%20and%20Sali%202001).

POLTEV, Valeri. Molecular Mechanics: principles, history, and current status. **Handbook Of Computational Chemistry**, Mexico, p. 1-48, 10 mar. 2016. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-94-007-6169-8_9-2

RABI, Firas A.; ZOUBI, Mazhar S. Al; KASASBEH, Ghena A.; SALAMEH, Dunia M.; AL-NASSER, Amjad D.. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, Jordan, v. 9, n. 3, p. 1-14, 20 mar. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-0817/9/3/231

REAVY, Brian; ZIEGLER, Angelika; DIPLEXCITO, Julie; MACINTOSH, Sybil M.; TORRANCE, Lesley; MAYO, Mike. Expression of Functional Recombinant Antibody Molecules in Insect Cell Expression Systems. **Protein Expression And Purification**, United Kingdom, v. 18, n. 2, p. 221-228, mar. 2000. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046592899911919

ROMANO, Maria; RUGGIERO, Alessia; SQUEGLIA, Flavia; MAGA, Giovanni; BERISIO, Rita. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: rna synthesis, proofreading and final capping. **Cells**, Italy, v. 9, n. 5, p. 1-22, 20 maio 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291026/

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A.. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers In Microbiology**, Argentina, v. 5, p. 1-17, 17 abr. 2014.Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full

SADDALA, Madhu Sudhana; KANDIMALLA, Ramesh; ADI, Pradeepkiran Jangampalli; BHASHYAM, Sainath Sri; ASUPATRI, Usha Rani. Novel 1, 4-dihydropyridines for L-type calcium channel as antagonists for cadmium toxicity. **Scientific Reports**, India, v. 7, n. 1, p. 1-13, 27 mar. 2017. Disponível em: https://www.nature.com/articles/srep45211

SAKAMOTO, Seiichi; TAURA, Futoshi; TSUCHIHASHI, Ryota; PUTALUN, Waraporn; KINJO, Junei; TANAKA, Hiroyuki; MORIMOTO, Satoshi. Expression, Purification, and Characterization of Anti-Plumbagin Single-Chain Variable Fragment Antibody in Sf9 Insect

Cell. **Hybridoma**, Japan, v. 29, n. 6, p. 481-488, dez. 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087101/

SALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L.. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal Of Molecular Biology**, England, v. 234, n. 3, p. 779-815, dez. 1993. Disponvelí em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283683716268

SAMUDRALA, Pavan Kumar; KUMAR, Pramod; CHOUDHARY, Kamlesh; THAKUR, Nagender; WADEKAR, Gaurav Suresh; DAYARAMANI, Richa; AGRAWAL, Mukta; ALEXANDER, Amit. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal Of Pharmacology**, India, v. 883, p. 1-12, set. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299920304672

SARGSYAN, Karen; GRAUFFEL, Cédric; LIM, Carmay. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, Taiwan, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 16 mar. 2017. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.7b00028

SARKER, Animesh; RATHORE, Abhishek Singh; GUPTA, Rinkoo Devi. Evaluation of scFv protein recovery from E. coli by in vitro refolding and mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, India, v. 18, n. 1, p. 1-12, 14 jan. 2019. Disponível em: https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-019-1053-9

SATHEESHKUMAR, Padikara Kutty. Expression of Single Chain Variable Fragment (scFv) Molecules in Plants: a comprehensive update. **Molecular Biotechnology**, India, v. 62, n. 3, p. 151-167, 8 fev. 2020. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-020-00241-3

SCHROEDER, Harry W.; CAVACINI, Lisa. Structure and function of immunoglobulins. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, United States Of America, v. 125, n. 2, p. 41-52, fev. 2010. Disponível em: https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(09)01465-1/fulltext

SCOHY, Anaïs; ANANTHARAJAH, Ahalieyah; BODÉUS, Monique; KABAMBA-MUKADI, Benoît; VERROKEN, Alexia; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, Hector. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. **Journal Of Clinical Virology**, Belgium, v. 129, p. 1-4, ago. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653220301979

SELA-CULANG, Inbal; KUNIK, Vered; OFRAN, Yanay. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. **Frontiers In Immunology**, Israel, v. 4, p. 1-13, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24115948/

SGRO, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. **Toxicology**, France, v. 105, n. 1, p. 23-29, 20 dez. 1995. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0300483X9503123W?via%3Dihub

SHEN, Min-Yi; SALI, Andrej. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, United States Of America, v. 15, n. 11, p. 2507-2524, nov. 2006. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.062416606

SHETTY, Rajesh M; ACHAIAH, Nithya C; SUBBARAJASETTY, Sindhu B. R0 and Re of COVID-19: can we predict when the pandemic outbreak will be contained?. **Indian Journal Of Critical Care Medicine**, India, v. 24, n. 11, p. 1125-1127, 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7751056/

SIEVERS, Fabian; WILM, Andreas; DINEEN, David; GIBSON, Toby J; KARPLUS, Kevin; LI, Weizhong; LOPEZ, Rodrigo; MCWILLIAM, Hamish; REMMERT, Michael; SÖDING, Johannes. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, Ireland, v. 7, n. 1, p. 1-6, jan. 2011. Disponível em: https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/msb.2011.75

SIEVERS, Fabian; HIGGINS, Desmond G.. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, Ireland, v. 27, n. 1, p. 135-145, 30 out. 2017. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3290

SIMABUCO, Fernando Moreira; TAMURA, Rodrigo Esaki; PAVAN, Isadora Carolina Betim; MORALE, Mirian Galliote; VENTURA, Armando Morais. Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses. **Genetics And Molecular Biology**, Brasil, v. 44, n. 11, p. 1-18, 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7731901/

SINGH, Surjit; KUMAR, Nitish K.; DWIWEDI, Pradeep; CHARAN, Jaykaran; KAUR, Rimplejeet; SIDHU, Preeti; CHUGH, Vinay K.. Monoclonal Antibodies: a review. **Current Clinical Pharmacology**, India, v. 13, n. 2, p. 85-99, 9 out. 2018. Disponível em: https://www.eurekaselect.com/154790/article

SIPPL, Manfred J.. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, Austria, v. 17, n. 4, p. 355-362, dez. 1993a. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.340170404

SIPPL, Manfred J.. Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, Austria, v. 7, n. 4, p. 473-501, ago. 1993b. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8229096/

SORMANNI, Pietro; APRILE, Francesco A.; VENDRUSCOLO, Michele. Rational design of antibodies targeting specific epitopes within intrinsically disordered proteins. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, United Kingdom, v. 112, n. 32, p. 9902-9907, 27 jul. 2015. Disponível em: https://www.pnas.org/content/112/32/9902

SORMANNI, Pietro; APRILE, Francesco A.; VENDRUSCOLO, Michele. Third generation antibody discovery methods: in silicorational design. **Chemical Society Reviews**, United Kingdom, v. 47, n. 24, p. 9137-9157, 2018. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/cs/c8cs00523k#!divAbstract

STERNBERG, Ariane; NAUJOKAT, Cord. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: targets for vaccination. **Life Sciences**, Germany, v. 257, p. 1-8, set. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320520308079

SUN, H.. COMPASS: an ab initio force-field optimized for condensed-phase applicationsoverview with details on alkane and benzene compounds. **The Journal Of Physical Chemistry** B, California, v. 102, n. 38, p. 7338-7364, 29 ago. 1998. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp980939v

SUN, Yi; HUANG, Tian; HAMMARSTRÖM, Lennart; ZHAO, Yaofeng. The Immunoglobulins: new insights, implications, and applications. **Annual Review Of Animal Biosciences**, China, v. 8, n. 1, p. 145-169, 15 fev. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31846352/

SUNDBERG, Eric J.; URRUTIA, Mariela; BRADEN, Bradford C.; ISERN, Jordi; TSUCHIYA, Daisuke; FIELDS, Barry A.; MALCHIODI, Emilio L.; TORMO, José; SCHWARZ, Frederick P.; MARIUZZA, Roy A.. Estimation of the Hydrophobic Effect in an Antigen−Antibody Protein−Protein Interface. **Biochemistry**, Argentina, v. 39, n. 50, p. 15375-15387, dez. 2000. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi000704l

TAI, Wanbo; HE, Lei; ZHANG, Xiujuan; PU, Jing; VORONIN, Denis; JIANG, Shibo; ZHOU, Yusen; DU, Lanying. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of rbd protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. **Cellular & Molecular Immunology**, China, v. 17, n. 6, p. 613-620, 19 mar. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41423-020-0400-4

TANG, Ke; ZHANG, Jinfeng; LIANG, Jie. Fast Protein Loop Sampling and Structure Prediction Using Distance-Guided Sequential Chain-Growth Monte Carlo Method. **Plos Computational Biology**, United States Of America, v. 10, n. 4, p. 1-16, 24 abr. 2014. Disponível em: https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003539

The Plumed CONSORTIUM. Promoting transparency and reproducibility in enhanced molecular simulations. **Nature Methods**, v. 16, n. 8, p. 670-673, 30 jul. 2019. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41592-019-0506-8#citeas

THOMAS, Sunil. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. **Pathogens And Immunity**, United States Of America, v. 5, n. 1, p. 1-22, 19 out. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7608487/

TIBERTI, Matteo; TERKELSEN, Thilde; CREMERS, Tycho Canter; MARCO, Miriam di; PIEDADE, Isabelle da; MAIANI, Emiliano; PAPALEO, Elena. MutateX: an automated pipeline for in-silico saturation mutagenesis of protein structures and structural ensembles. **Biorxiv**, Denmark, p. 1-21, 3 nov. 2019. Disponível em: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/824938v1

TILLER, Kathryn E.; TESSIER, Peter M.. Advances in Antibody Design. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, New York, v. 17, n. 1, p. 191-216, 7 dez. 2015. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733

TINA, K. G.; BHADRA, R.; SRINIVASAN, N.. PIC: protein interactions calculator. **Nucleic Acids Research**, India, v. 35, n. , p. 473-476, 8 maio 2007. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W473/2924194

TRAN, Ngoc Tuan; JAKOVLIć, Ivan; WANG, Wei-Min. In silico characterisation, homology modelling and structure-based functional annotation of blunt snout bream (Megalobrama amblycephala) Hsp70 and Hsc70 proteins. **Journal Of Animal Science And Technology**, China, v. 57, n. 1, p. 1-9, dez. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678458/

UY, Geoffrey L.; ALDOSS, Ibrahim; FOSTER, Matthew C.; SAYRE, Peter H.; WIEDUWILT, Matthew J.; ADVANI, Anjali S.; GODWIN, John E.; ARELLANO, Martha L.; SWEET, Kendra L.; EMADI, Ashkan. Flotetuzumab as salvage immunotherapy for refractory acute myeloid leukemia. **Blood**, United States Of America, v. 137, n. 6, p. 751-762, 11 fev. 2021. Disponível em: https://ashpublications.org/blood/article/137/6/751/463757/Flotetuzumab-as-salvage-immunotherapy-for

VABRET, Nicolas; BRITTON, Graham J.; GRUBER, Conor; HEGDE, Samarth; KIM, Joel; KUKSIN, Maria; LEVANTOVSKY, Rachel; MALLE, Louise; MOREIRA, Alvaro; PARK, Matthew D.. Immunology of COVID-19: current state of the science. **Immunity**, United States Of America, v. 52, n. 6, p. 910-941, jun. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761320301837

VAN OSS, C.J.; GOOD, R.J.; CHAUDHURY, M.K.. Nature of the antigen-antibody interaction. **Journal Of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, United States Of America, v. 376, p. 111-119, abr. 1986. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378434700808282

VANGONE, Anna; BONVIN, Alexandre Mjj. Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. **Elife,** Netherlands, v. 4, p. 1-15, 20 jul. 2015. Disponível em: https://elifesciences.org/articles/07454

VANOMMESLAEGHE, Kenno; GUVENCH, Olgun; MACKERELL JUNIOR, Alexander D.. Molecular Mechanics. Current Pharmaceutical Design, Baltimore, v. 20, n. 20, p. 3281-3292, 1 jan. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026342/

VENDEL, Michelle C.; FAVIS, Michael; SNYDER, William B.; HUANG, Flora; CAPILI, Allan D.; DONG, Jianying; GLASER, Scott M.; MILLER, Brian R.; DEMAREST, Stephen J.. Secretion from bacterial versus mammalian cells yields a recombinant scFv with variable folding properties. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, United States Of America, v. 526, n. 2, p. 188-193, out. 2012. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986111004309?via%3Dihub

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for sars-cov-2. **Nature Reviews Microbiology**, Switzerland, v. 19, n. 3, p. 155-170, 28 out. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6

WADANAMBI, Padmika. Computational approach to identify potential antileishmanial activity of reported inhibitor, E5700 and two natural alkaloids against Leishmania donovani Squalene Synthase. **Experimental Results**, Sri Lanka, v. 1, n. 31, p. 1-13, 2020. Disponível em: https://is.gd/XF1kKt

WALLS, Alexandra C.; PARK, Young-Jun; TORTORICI, M. Alejandra; WALL, Abigail; MCGUIRE, Andrew T.; VEESLER, David. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, United States Of America, v. 181, n. 2, p. 281-292, abr. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302622

WANG, Ying; SHAN, Yaming; GAO, Xinyu; GONG, Rui; ZHENG, Jun; ZHANG, Xiaohua Douglas; ZHAO, Qi. Screening and expressing HIV-1 specific antibody fragments in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular Immunology**, China, v. 103, p. 279-285, nov. 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016158901830676X

WARSZAWSKI, Shira; KATZ, Aliza Borenstein; LIPSH, Rosalie; KHMELNITSKY, Lev; NISSAN, Gili Ben; JAVITT, Gabriel; DYM, Orly; UNGER, Tamar; KNOP, Orli; ALBECK, Shira. Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. Plos Computational Biology, Israel, v. 16, n. 10, p. 1-24, 21 out. 2020. Disponível em: https://journals.plos.org/ploscompbiol/article/authors?id=10.1371/journal.pcbi.1007207

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols In Bioinformatics**, California, v. 54, n. 1, p. 1-55, jun. 2016. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27322406/

WEBB, B.; ESWAR, N.; FAN, H.; KHURI, N.; PIEPER, U.; DONG, G.Q.; SALI, A.. Comparative Modeling of Drug Target Proteins. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, United States Of America, p. 215-236, 1 out. 2014. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157477/

WEISSLEDER, Ralph; LEE, Hakho; KO, Jina; PITTET, Mikael J.. COVID-19 diagnostics in context. **Science Translational Medicine**, United States Of America, v. 12, n. 546, p. 1-7, 3 jun. 2020. Disponível em: https://stm.sciencemag.org/content/12/546/eabc1931/tab-pdf

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J.. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, Austria, v. 35, n. , p. 407-410, 8 maio 2007. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W407/2920938

WIERSINGA, W. Joost; RHODES, Andrew; CHENG, Allen C.; PEACOCK, Sharon J.; PRESCOTT, Hallie C.. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Jama**, Netherlands, v. 324, n. 8, p. 1-13, 25 ago. 2020. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391

WILKINSON, Ian C.; HALL, Catherine J.; VEVERKA, Vaclav; SHI, Jiye Y.; MUSKETT, Frederick W.; STEPHENS, Paul E.; TAYLOR, Richard J.; HENRY, Alistair J.; CARR, Mark D.. High Resolution NMR-based Model for the Structure of a scFv-IL-1β Complex. J**ournal**

Of Biological Chemistry, United Kingdom, v. 284, n. 46, p. 31928-31935, nov. 2009. Disponível em: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)37940-0/fulltext

WU, Fan; ZHAO, Su; YU, Bin; CHEN, Yan-Mei; WANG, Wen; SONG, Zhi-Gang; HU, Yi; TAO, Zhao-Wu; TIAN, Jun-Hua; PEI, Yuan-Yuan. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, China, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 3 fev. 2020a. Disponvíel em: https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3

WU, Joseph T; LEUNG, Kathy; LEUNG, Gabriel M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, China, v. 395, n. 10225, p. 689-697, fev. 2020b. Disponível em: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30260-9/fulltext

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M.. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **Jama**, China, v. 323, n. 13, p. 1-4, 7 abr. 2020c. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130

XUE, Li C.; RODRIGUES, João Pglm; KASTRITIS, Panagiotis L.; BONVIN, Alexandre Mjj; VANGONE, Anna. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, Netherlands, p. 1-3, 8 ago. 2016. Disponível em: https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/23/3676/2525629

YAMAYOSHI, Seiya; SAKAI-TAGAWA, Yuko; KOGA, Michiko; AKASAKA, Osamu; NAKACHI, Ichiro; KOH, Hidefumi; MAEDA, Kenji; ADACHI, Eisuke; SAITO, Makoto; NAGAI, Hiroyuki. Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19. **Viruses**, Japan, v. 12, n. 12, p. 1-8, 10 dez. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/1999-4915/12/12/1420

YAN, Changhui; WU, Feihong; JERNIGAN, Robert L.; DOBBS, Drena; HONAVAR, Vasant. Characterization of Protein–Protein Interfaces. **The Protein Journal**, United States Of America, v. 27, n. 1, p. 59-70, 13 jan. 2008. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566606/

YANG, Yongshi; PENG, Fujun; WANG, Runsheng; GUAN, Kai; JIANG, Taijiao; XU, Guogang; SUN, Jinlyu; CHANG, Christopher. The deadly coronaviruses: the 2003 sars pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in china. **Journal Of Autoimmunity**, China, v. 109, p. 1-16, maio 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896841120300470

YOU, Wanli; TANG, Zhiye; CHANG, Chia-En A.. Potential Mean Force from Umbrella Sampling Simulations: what can we learn and what is missed?. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, United States Of America, v. 15, n. 4, p. 2433-2443, 27 fev. 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6456367/

YUAN, Meng; WU, Nicholas C.; ZHU, Xueyong; LEE, Chang-Chun D.; SO, Ray T. Y.; LV, Huibin; MOK, Chris K. P.; WILSON, Ian A.. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Science**, United States Of America, v. 368, n. 6491, p. 630-633, 3 abr. 2020. Disponível em: https://science.sciencemag.org/content/368/6491/630

YUAN, Shuguang; CHAN, H.C. Stephen; HU, Zhenquan. Using PyMOL as a platform for computational drug design. **Wires Computational Molecular Science**, Switzerland, v. 7, n. 2, p. 1-10, 5 jan. 2017. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcms.1298

YUKI, Koichi; FUJIOGI, Miho; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. COVID-19 pathophysiology: a review. Clinical Immunology, United States Of America, v. 215, p. 1-8, jun. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7169933/

ZALZALA, H.H.. Diagnosis of COVID-19: facts and challenges. **New Microbes And New Infections**, Iraq, v. 38, p. 1-8, nov. 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7492157/

ZAREI, Najmeh; VAZIRI, Behrouz; SHOKRGOZAR, Mohammad Ali; MAHDIAN, Reza; FAZEL, Ramin; KHALAJ, Vahid. High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in Pichia pastoris. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Iran, v. 98, n. 24, p. 10023-10039, 21 set. 2014. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-014-6071-2

ZENG, Weihong; LIU, Guangfeng; MA, Huan; ZHAO, Dan; YANG, Yunru; LIU, Muziying; MOHAMMED, Ahmed; ZHAO, Changcheng; YANG, Yun; XIE, Jiajia. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, China, v. 527, n. 3, p. 618-623, jun. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20308767

ZHANG, Yang. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Kansas, v. 69, n. 8, p. 108-117, 2007. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.21702

ZHENG, Jun. SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat. **International Journal Of Biological Sciences**, China, v. 16, n. 10, p. 1678-1685, 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7098030/

ZHOU, Daming; DUYVESTEYN, Helen M. E.; CHEN, Cheng-Pin; HUANG, Chung-Guei; CHEN, Ting-Hua; SHIH, Shin-Ru; LIN, Yi-Chun; CHENG, Chien-Yu; CHENG, Shu-Hsing; HUANG, Yhu-Chering. Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient. **Nature Structural & Molecular Biology**, United Kingdom, v. 27, n. 10, p. 950-958, 31 jul. 2020. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41594-020-0480-y

APÊNDICE A - Construção das sequências primárias dos anticorpos scFv utilizados na modelagem por meio do servidor MODELLER 10.1

A.1 Sequência FASTA das estruturas utilizadas na construção do anticorpo scFv-CR3022 obtidas pelo próprio PDB, onde o "modelo" se refere à sequência alvo a ser modelada com a alça de glicina e serina (destacado em cinza) unindo ambas porções Fv do anticorpo.

>modelo
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGT
TVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS
VLYSSINKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKVEIKRT
*

>2KH2:B
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSGNIHNYLTWYQQKPGKAPQLLIYNAKTLADG
VPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFANYYCQHFWSLPFTFGQGTKVEIKRTGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYDMSWVRQAP
GKRLEWVAYISSGGGSTYFPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RQNKKLTWFDYWGQGTLVTVSSHHHHHH
*

>6W41:H
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGT
TVTVSSASTDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSINKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQG
TKVEIKRT
*

A.2 Alinhamento múltiplo de sequências FASTA utilizadas na construção do anticorpo scFv-CR3022 realizado pelos algoritmos do programa Clustal Omega e obtidos no formato de leitura adequada para o servidor MODELLER 10.1 (extensão .pir) utilizando a linha de comando *clustalw -infile=arquivo.fasta -output=pir* através do terminal linux Ubuntun 18.04.5.

>P1;modelo
sequence:modelo:1:A:257:A::::
QMQLVQSGTEVKK-PGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGTT
VTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL
YSSINKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES-----GVPDRFSGS--GSGTDFTLTISSLQ
AEDVAVYYCQQYYSTP---YTFGQGTKVEIKRT-----
*

>P1;6W41
structure:6W41:1:H:237:H::::
QMQLVQSGTEVKK-PGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGTT
VTVSSAST----------DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSINKNYLAW
YQQKPGQPPKLLIYWASTRES-----GVPDRFSGS--GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTP---YTFGQGTKVEIKRT-----
*

>P1;2KH2
structure:2KH2:1:B:254:B::::
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSGN--IHNYLTWYQQKPGKAPQLL--IYNAKTLAD
GVP-----SRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFANYYCQHFWSLP---FTFGQGTKVEIKRTGG
GG--SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS-LRLSCAASG----FDFSRYDMS
WVRQAPGKRLEWVAYISSGGGSTYFPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARQNKKLTWFDYWGQGTLVTVSSHHHHHH
*

A.3 Sequência FASTA das estruturas utilizadas na construção do anticorpo scFv otimizado obtidas pelo próprio PDB, onde o "modelo" se refere ao anticorpo scFv MAD22 a ser modelada com a alça de glicina e serina (destacado em cinza) unindo ambas porções Fv do anticorpo e as mutações realizadas.

>modelo
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGEQFIMYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPKDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGPGLSTPMEVWGQGT
TVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSV
LYRRINFNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASRRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE
DVAVYYCQQYYRTPYTFGQGTKVEIKRT
*

>2KH2:B
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSGNIHNYLTWYQQKPGKAPQLLIYNAKTLADG
VPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFANYYCQHFWSLPFTFGQGTKVEIKRTGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYDMSWVRQAP
GKRLEWVAYISSGGGSTYFPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RQNKKLTWFDYWGQGTLVTVSSHHHHHH
*

>6W41:H
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGT
TVTVSSASTDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSINKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQG
TKVEIKRT
*

A.4 Alinhamento múltiplo de sequências FASTA utilizadas na construção do anticorpo scFv MAD22 realizado pelos algoritmos do programa Clustal Omega e obtidos no formato de leitura adequada para o servidor MODELLER 10.1 (extensão .pir) utilizando a linha de comando *clustalw -infile=arquivo.fasta -output=pir* através do terminal linux Ubuntun 18.04.5.

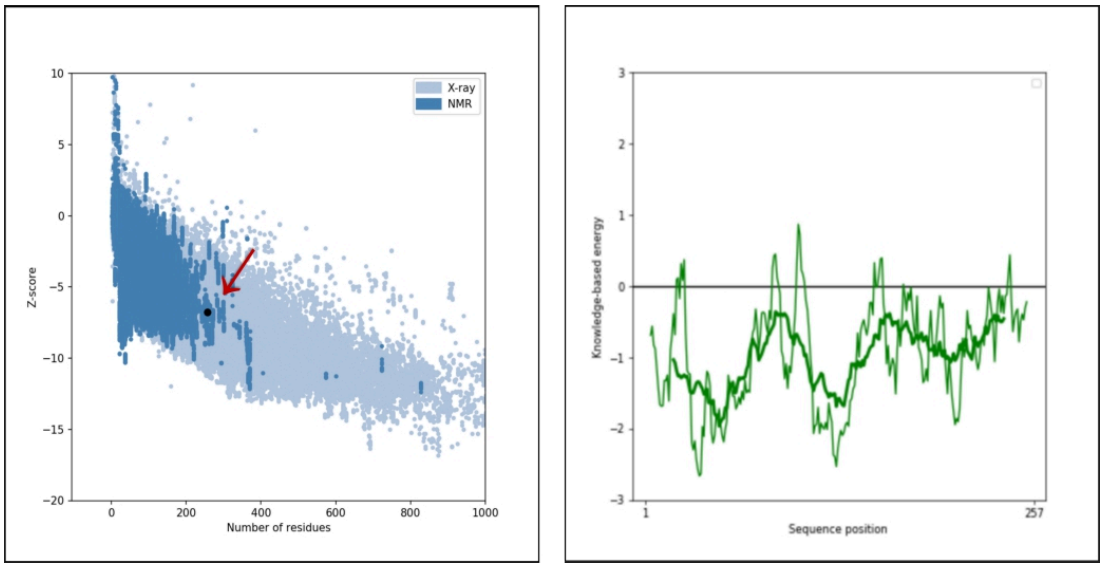
>P1;modelo
sequence:modelo:1:A:257:A::::
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGEQFIMYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPKDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGPGLSTPMEVWGQGT
TVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSV
LYRRINFNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASRRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE
DVAVYYCQQYYRTPYTFGQGTKVEIKRT-----
*

>P1;6W41
structure:6W41:1:H:237:H::::
QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
ETRYSPSFQGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQGT
TVTVSSAS----------TDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSINKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY
YSTPYTFGQGTKVEIKRT-----
*

>P1;2KH2
structure:2KH2:1:B:254:B::::
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSG--NIHNYLTWYQQKPGKAPQLL--IYNAKTLAD
GVP-----SRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFANYYCQH---FWSLPFTFGQGTKVEIKRTGG
GG--SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS-LRLSCAASG----FDFSRYDMS
WVRQAPGKRLEWVAYISSGGGSTYFPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARQNKKLTWFDYWGQGTLVTVSSHHHHHH
*

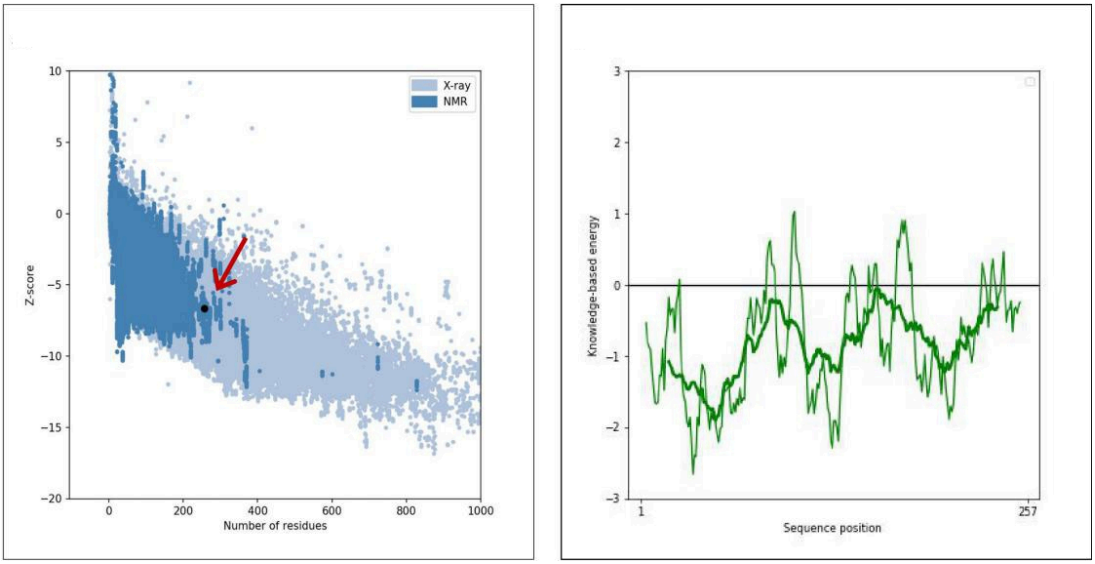
APÊNDICE B - Validação dos modelos de anticorpos scFv construídos pelo método de modelagem comparativa

B.1 Gráficos de energia obtidos pelo servidor ProSA-web para o anticorpo scFv-CR3022



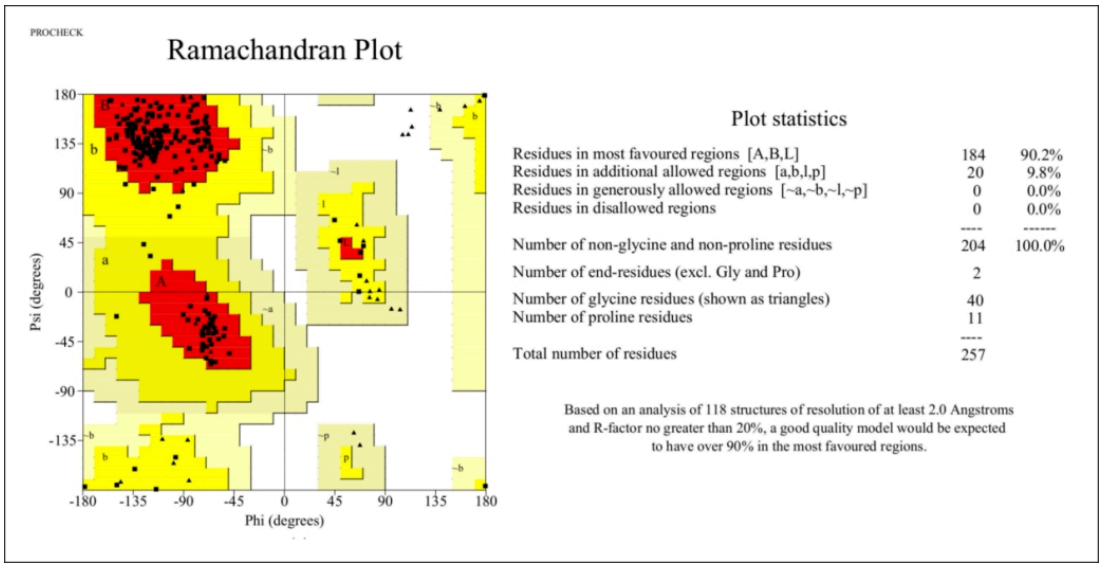
Fonte: Este trabalho.

B.2 Gráficos de energia obtidos pelo servidor ProSA-web para o anticorpo scFv MAD22

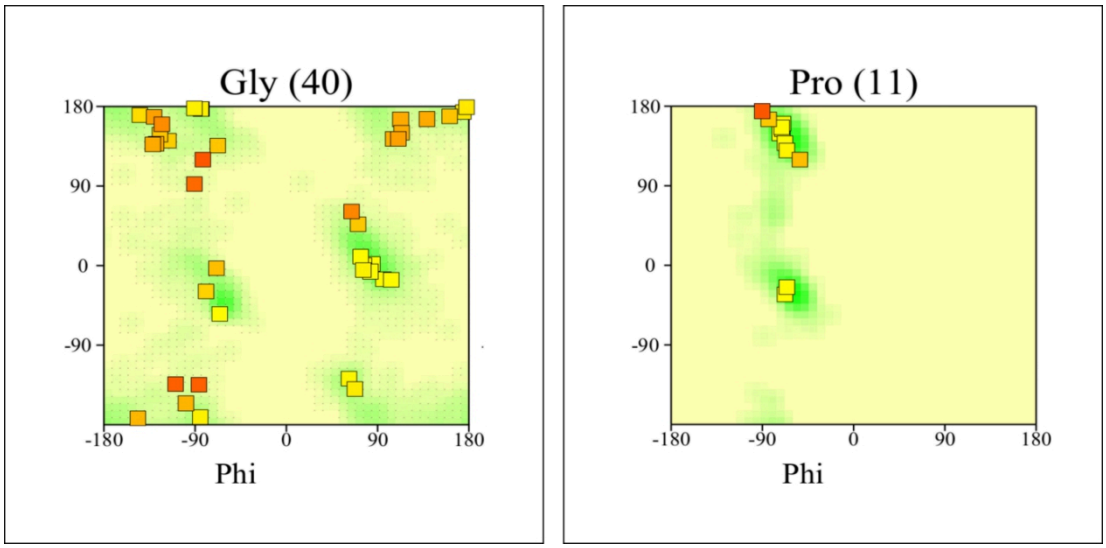


Fonte: Este trabalho.

B.3 Gráficos de Ramachandran obtidos para o anticorpo scFv-CR3022 demonstrando a qualidade estereoquímica do modelo gerado

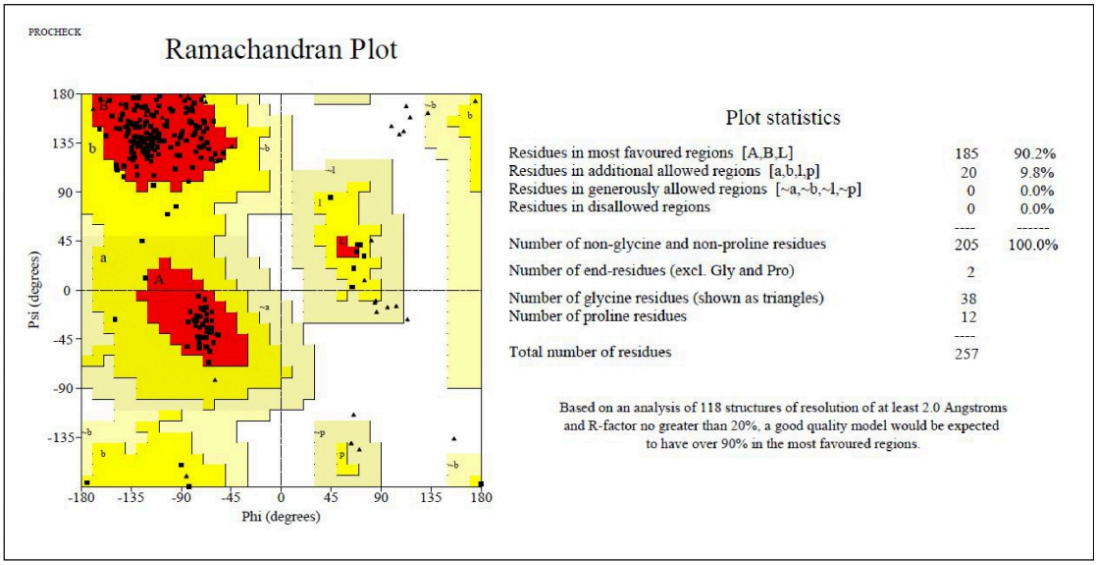


Fonte: Este trabalho.

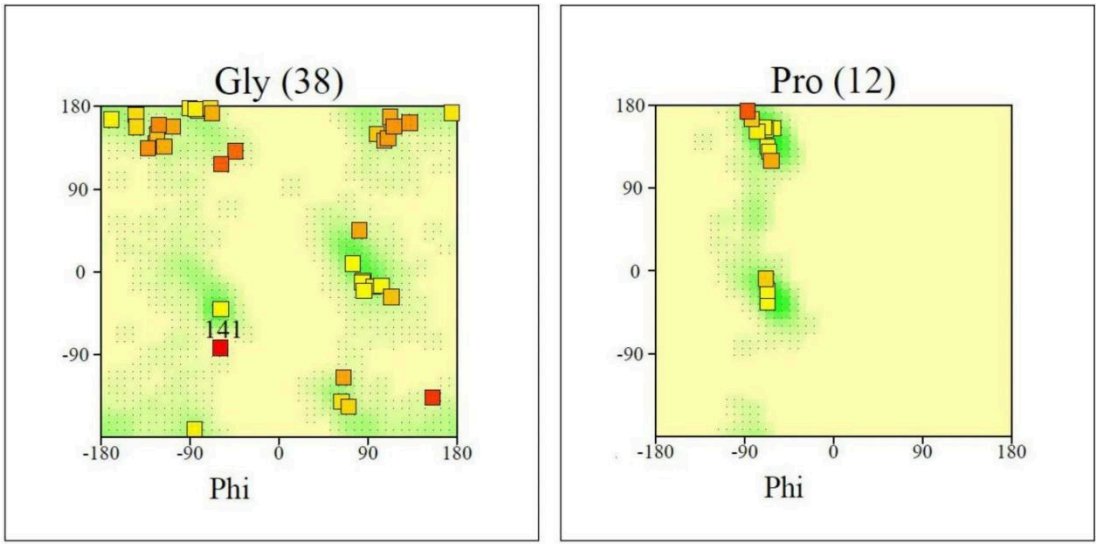


Fonte: Este trabalho.

B.4 Gráficos de Ramachandran obtidos para o anticorpo scFv-CR3022 demonstrando a qualidade estereoquímica do modelo gerado

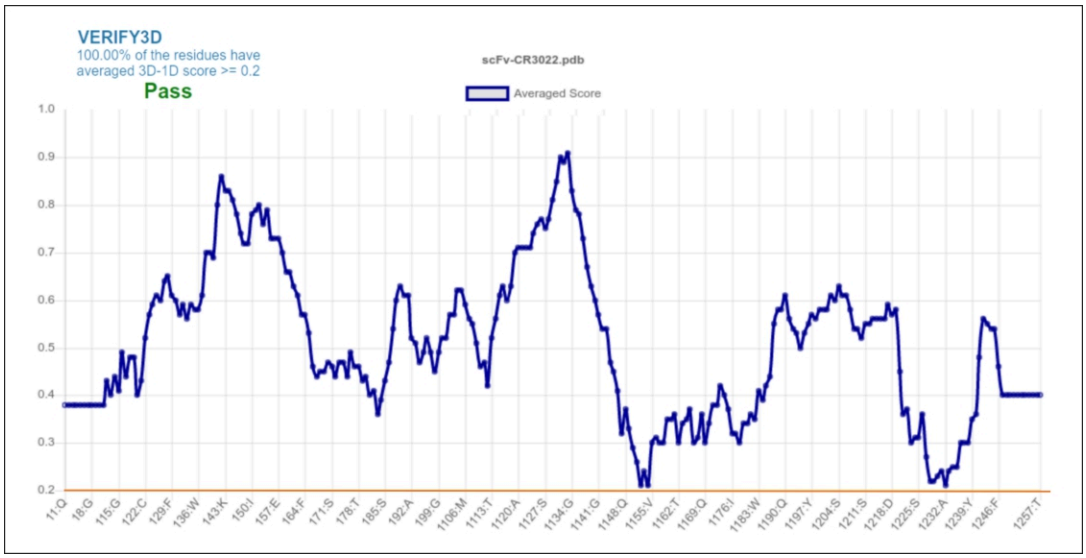


Fonte: Este trabalho.



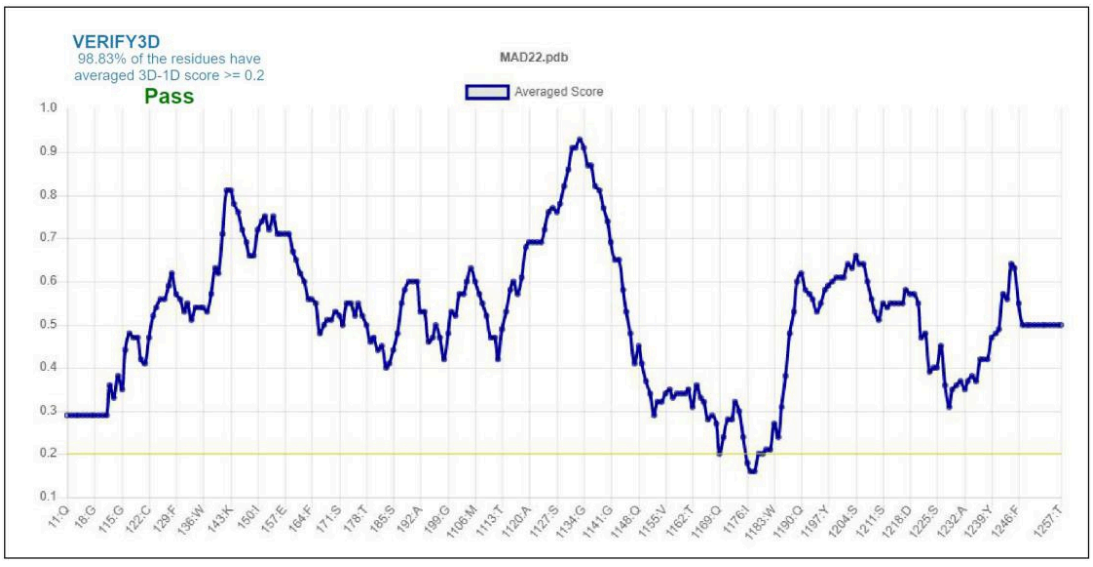
Fonte: Este trabalho.

B.5 Gráficos obtidos pelo servidor VERIFY3D demontrando a relação existente entre a sequência 1D e a estrutura 3D para o anticorpo scFv-CR3022



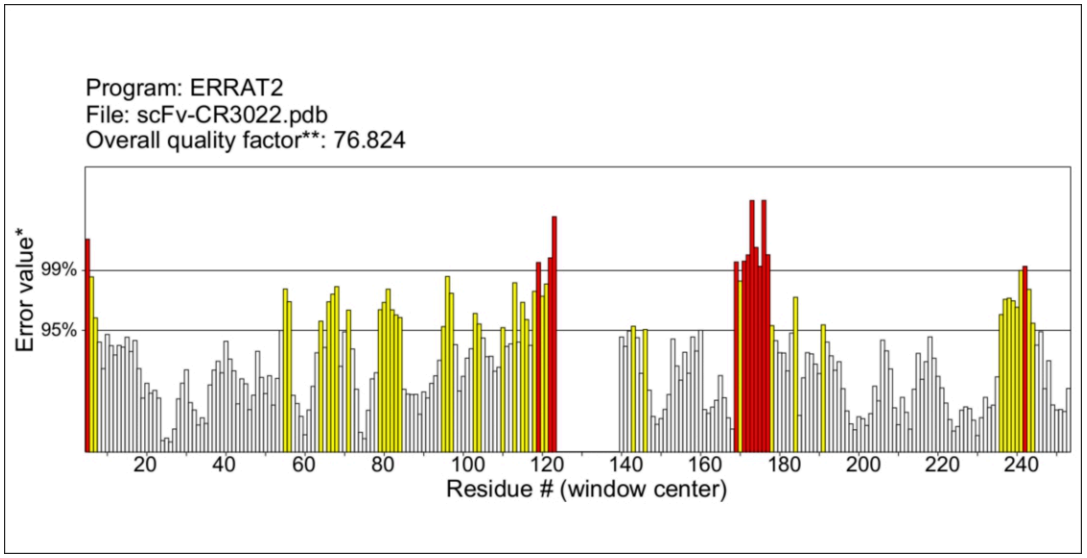
Fonte: Este trabalho.

B.6 Gráficos obtidos pelo servidor VERIFY3D demontrando a relação existente entre a sequência 1D e a estrutura 3D para o anticorpo scFv MAD22



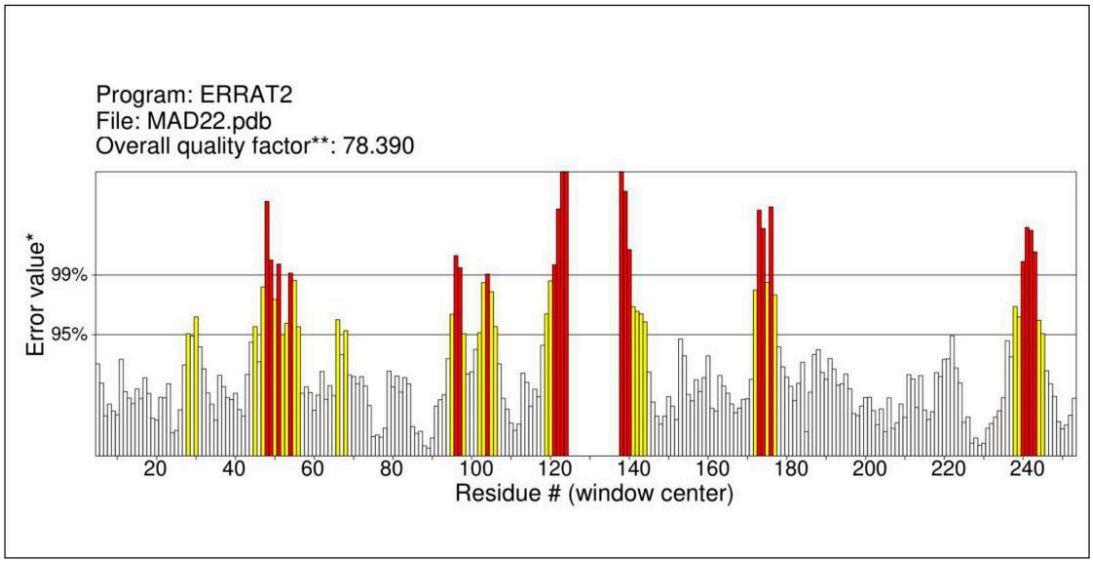
Fonte: Este trabalho.

B.7 Gráficos gerados pelo servidor ERRAT demonstrando as análises realizadas para as interações entre átomos não ligados presentes na estrutura do anticorpo scFv-CR3022



Fonte: Este trabalho.

B.8 Gráficos gerados pelo servidor ERRAT demonstrando as análises realizadas para as interações entre átomos não ligados presentes na estrutura do anticorpo scFv MAD22



Fonte: Este trabalho.

APÊNDICE C - Caracterização da natureza de interação entre os anticorpos scFv e a proteína RBD pelos servidores PIC e PISA.

C.1 Ocorrência de interação hidrofóbicas em até 5 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Interação Hidrofóbica			
SARS-CoV-2 RBD	scFv-CR3022	SARS-CoV-2 RBD	scFv-CR3022
TYR 369	TYR 27	LEU 390	TRP 198
PHE 374	ILE 30	PHE 392	ILE 176
TYR 380	ILE 102	LEU 517	ILE 176
TYR 380	TRP 33		

Fonte: Este trabalho.

C.2 Ocorrência de interações cátion-π em até 6 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Interações Cátion-π		
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
LYS 378 [NZ]	5.37	TYR 52 [Ar]
LYS 386 [NZ]	5.35	TYR 197 [Ar]

Fonte: Este trabalho.

C.3 Ocorrência de empilhamento do tipo π-π entre 4.5 Å a 7 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Empilhamento π-π		
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
TYR 380 [Ar]	5.88	TRP 33 [Ar]

Fonte: Este trabalho.

C.4 Ocorrência de ligações de hidrogênio em até 3 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Ligação de Hidrogênio					
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv MAD22	SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv MAD22
TYR 369 [OH]	3.00	MET 31 [1HE]	GLY 381 [1HA]	2.70	TYR 180 [OH]
ASN 370 [OD1]	2.70	GLN 28 [2HE2]	GLY 381 [2HA]	3.00	TYR 180 [OH]
PHE 377 [H]	2.01	TYR 52 [OH]	THR 385 [HG1]	2.30	MET 31 [SD]
PHE 377 [O]	2.70	TYR 52 [HH]	LYS 386 [1HE]	2.30	GLU 107 [OE2]
LYS 378 [1HZ]	3.00	GLU 57 [OE1]	LYS 386 [1HZ]	2.00	GLU 203 [OE2]
LYS 378 [2HZ]	1.90	GLU 57 [OE1]	ASP 389 [O]	2.50	ARG 201 [2HH2]
LYS 378 [2HE]	2.50	ASP 55 [OD1]	ASP 389 [OD2]	2.30	ARG 201 [1HH2]
LYS 378 [1HZ]	2.00	ASP 55 [OD2]	ARG 408 [1HG]	2.50	ASP 55 [OD2]
CYS 379 [O]	1.90	LEU 102 [H]	ASP 427 [O]	2.00	ARG 241 [2HH1]
TYR 380 [O]	2.00	SER 103 [H]	ASP 428 [OD1]	1.90	ARG 241 [2HH2]
TYR 380 [O]	2.70	SER 103 [1HB]	GLU 516 [OE1]	2.80	ARG 175 [1HH2]
GLY 381 [O]	2.21	TYR 180 [HH]			

Fonte: Este trabalho.

C.5 Ocorrência de empilhamento do tipo π-π entre 4.5 Å a 7 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Empilhamento π-π		
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
TYR 380 [Ar]	6.67	TRP 33 [Ar]
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022

Fonte: Este trabalho.

C.6 Ocorrência de ligações iônicas em até 6 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Ligação Iônica					
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv MAD22	SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv MAD22
LYS 378 [NZ]	3.51	ASP 55 [OD1]	ASP 427 [OD2]	5.70	ARG 241 [NH1]
LYS 378 [NZ]	2.99	ASP 55 [OD2]	ASP 427 [OD2]	5.10	ARG 241 [NH2]
LYS 378 [NZ]	2.86	GLU 57 [OE1]	ASP 428 [OD1]	4.20	ARG 241 [NH1]
LYS 378 [NZ]	4.90	GLU 57 [OE2]	ASP 428 [OD1]	2.83	ARG 241 [NH2]
LYS 386 [NZ]	5.60	GLU 107 [OE1]	ASP 428 [OD2]	4.70	ARG 241 [NH2]
LYS 386 [NZ]	3.96	GLU 107 [OE2]	ASP 428 [OD1]	5.30	ARG 174 [NH1]
LYS 386 [NZ]	4.90	GLU 203 [OE1]	ASP 428 [OD2]	3.82	ARG 174 [NH1]
LYS 386 [NZ]	2.91	GLU 203 [OE2]	ASP 428 [OD1]	4.80	ARG 174 [NH2]
ASP 389 [OD2]	3.17	ARG 201 [NH2]	ASP 428 [OD2]	3.22	ARG 174 [NH2]
ARG 408 [NH1]	5.40	ASP 55 [OD2]	ASP 428 [OD1]	5.90	ARG 174 [NE]
ARG 408 [NH2]	3.20	ASP 55 [OD2]	ASP 428 [OD2]	3.81	ARG 174 [NE]
ARG 408 [NH2]	4.10	ASP 55 [OD1]	GLU 516 [OE1]	5.30	ARG 175 [NH1]
ASP 427 [OD1]	5.80	ARG 241 [NH1]	GLU 516 [OE1]	3.28	ARG 175 [NH2]
ASP 427 [OD1]	5.90	ARG 241 [NH2]	GLU 516 [OE2]	5.40	ARG 175 [NH2]

Fonte: Este trabalho.

C.7 Ocorrência de interação do tipo Ar-S em até 5.3 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Aromático-Enxofre		
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv-CR3022
TYR 369 [Ar]	4.50	MET 31

Fonte: Este trabalho.

C.8 Ocorrência de interação hidrofóbicas em até 5 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Interação Hidrofóbica			
SARS-CoV-2 RBD	scFv MAD22	SARS-CoV-2 RBD	scFv MAD22
TYR 369	ILE 30	PRO 384	PRO 100
PHE 374	ILE 30	TYR 380	LEU 102
PHE 377	ILE 30	VAL 382	ILE 176
TYR 369	MET 31	PHE 392	ILE 176
PHE 377	MET 31	LEU 517	ILE 176
PRO 384	MET 31	LEU 517	PHE 178
TYR 380	TRP 33	LEU 390	TRP 198
PHE 377	TYR 52		

Fonte: Este trabalho.

C.9 Ocorrência de interações cátion-π em até 6 Å de distância entre o complexo formado pelo anticorpo scFv MAD22 e a proteína RBD do SARS-CoV-2 obtido pelo servidor PIC.

Interações Cátion-π		
SARS-CoV-2 RBD	Distância (Å)	scFv MAD22
LYS 378 [NZ]	5.95	TRP 33 [Ar]
LYS 378 [NZ]	5.56	TYR 52 [Ar]
LYS 386 [NZ]	5.66	TYR 197 [Ar]

Fonte: Este trabalho.

APÊNDICE D - Mutações sítio-dirigidas

D.1 - Resíduos de aminoácidos mutados com o objetivo de otimizar as interações formadas entre o anticorpo scFv-CR3022 e a proteína RBD do SARS-CoV-2.

Wildtype	Posição	Mutante	*Wildtype*	Posição	Mutante
TYR	27	GLU	ASP	107	GLU
GLY	28	GLN	SER	174	ARG
THR	31	MET	SER	175	ARG
GLY	54	LYS	LYS	178	PHE
SER	100	PRO	THR	201	ARG
ILE	102	LEU	SER	241	ARG

Fonte: Este trabalho.

APÊNDICE E - Trabalhos publicados durante o mestrado

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2020, *20*, 1-14 1

REVIEW ARTICLE

ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications

Walmir da Silva[1], Nancy da Rocha Torres[2], Joice de Melo Agripino[1], Victor Hugo Ferraz da Silva[2], Anna Cláudia Alves de Souza[1], Isadora Cunha Ribeiro[1], Tatiana Aparecida de Oliveira[1], Luciana Angelo de Souza[2], Lethicia Kelly Ramos Andrade[1], João Victor Badaró de Moraes[2], Marcel Arruda Diogo[1], Raíssa Barbosa de Castro[1], Marcelo Depolo Polêto[2], Luis Carlos Crocco Afonso[3] and Juliana Lopes Rangel Fietto[1,*]

[1]*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;* [2]*Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;* [3]*Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*

ARTICLE HISTORY

Received: May 21, 2020
Revised: July 27, 2020
Accepted: August 24, 2020

DOI:
10.2174/1568026620666201005125146

Abstract: ENTPDases are enzymes known for hydrolyzing extracellular nucleotides and playing an essential role in controlling the nucleotide signaling via nucleotide/purinergic receptors P2. Moreover, ENTPDases, together with Ecto-5′-nucleotidase activity, affect the adenosine signaling via P1 receptors. These signals control many biological processes, including the immune system. In this context, ATP is considered as a trigger to inflammatory signaling, while adenosine (Ado) induces anti-inflammatory response. The trypanosomatids Leishmania and *Trypanosoma cruzi*, pathogenic agents of Leishmaniasis and Chagas Disease, respectively, have their own ENTPDases named "TpENTPDases," which can affect the nucleotide signaling, adhesion and infection, in order to favor the parasite. Besides, TpENTPDases are essential for the parasite nutrition, since the Purine *De Novo* synthesis pathway is absent in them, which makes these pathogens dependent on the intake of purines and nucleopurines for the Salvage Pathway, in which TpENTPDases also take place. Here, we review information regarding TpNTPDases, including their known biological roles and their effect on the purinergic signaling. We also highlight the roles of these enzymes in parasite infection and their biotechnological applications, while pointing to future developments.

Keywords: ENTPDases, Purinergic signaling, Leishmaniasis, Chagas Disease, Parasites, Biotechnology.

1. INTRODUCTION

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) belong to the CD39 gene family. They have been characterized by the presence of five apyrase conserved regions (ACR1 to ACR5). They also catalyze the hydrolysis of tri- and diphosphate nucleosides to their monophosphate forms. Ecto-5'-nucleotidases (5′-NTs), which belong to the CD73 gene family, take these monophosphate nucleosides to hydrolyze them to nucleoside. In a highly controlled manner, ENTPDases and 5′-NTs are able to modulate the nucleotide purinergic signaling [1, 2].

These enzymes are ubiquitously expressed from mammals to unicellular pathogens, such as the protozoan *Leishmania* genus [3], *Trypanosoma cruzi* [4], and the bacteria *Legionella penumophila* [5]. In the CD39 gene family, some enzymes are localized at the cell surface (named Ecto-NTPDases or ENTPDases), while others are localized in internal compartments of the cells[3]. In mammalian, these ENTPDases are involved in the control of nucleotide/purinergic signaling, which controls diverse biological systems, such as blood clotting and the immune system [6]. These enzymes are also present in pathogens and have been described as participants in the purine uptake by Purine Salvage Pathway and in infection and virulence mechanisms [5-10].

The roles of ENTPDases in adhesion, infection and virulence of pathogens have been studied by many research groups. The current understanding is that enhanced ENTPDase hydrolysis of ATP and ADP is associated with the production of Ado by 5′-NT, which leads to higher virulence and plays a pivotal role on the subversion or blockage of host-defense mechanisms [1, 3-6, 11-17]. At least part of these effects is a consequence of the control of nucleotide/purinergic signaling on host cells and tissues (Fig. **1**).

It has been demonstrated that nucleotides are able to stimulate the purinergic P1 and P2 receptors on the host cell membrane [14]. These events play an important role in the

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; E-mail: jufietto@ufv.br

1568-0266/20 $65.00+.00 © 2020 Bentham Science Publishers

Revista Fitos

ARTIGO DE PESQUISA

Plantago major L. (Plantaginaceae) pode ser utilizado como agente antimicrobiano para emprego em produtos para uso oral?

May *Plantago major* L. (Plantaginaceae) be used as an antimicrobial agent for use in oral application products?

https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1005

Nogueira, Maria Luiza de Oliveira[1]; Lima, Leandro Martins[1]; Lemos, Ari Sérgio de Oliveira[1]; Diogo, Marcel Arruda[1]; Souza, Thalita de Freitas[2]; Silva, João Paulo Santana da[1]; Silva Filho, Ademar Alves da[3]; Chedier, Luciana Moreira[2]; Fabri, Rodrigo Luiz[1]; Pinto, Priscila de Faria[1]*.

[1]Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, *Campus* Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

[2]Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, *Campus* Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

[3]Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, *Campus* Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

*Correspondência: priscila.faria@ufjf.br.

Resumo

Plantago major L. (Plantaginaceae) é uma planta utilizada no tratamento de feridas e tosse devido ao seu potencial anti-inflamatório, cicatrizante e antimicrobiano. Visando o emprego da planta na formulação de produtos para uso oral, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana desta espécie *in vitro*. Extratos etanólico e hidroalcoólico, preparados com partes aéreas de *P. major*, foram submetidos à triagem fitoquímica e análise de cromatografia em camada delgada (CCD). A atividade antimicrobiana dos extratos e de tintura comercial foi testada frente a *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* por difusão em ágar. As análises fitoquímicas demonstraram a presença de substâncias fenólicas, cumarinas e triterpenos, além de baixo teor de fenóis e flavonoides nos extratos. Os sinais observados na CCD demonstraram ausência do marcador químico, ácido 5-O-cafeoilquínico, porém o número de classes de substâncias encontradas e a presença de um provável derivado de ácido 5-O-cafeoilquínico condizem com exemplares de *P. major*. Na avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos alcoólicos e tintura não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, entretanto não deve ser descartada a sua ação anti-inflamatória devido as substâncias encontradas e o seu uso em sinergismo como outros agentes antimicrobianos para o desenvolvimento de produtos de uso oral.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Fitoterapia. Agentes antimicrobianos. Cromatografia em camada delgada.

ANEXO A - *Scripts*

A.1 *Script* utilizado para a modelagem da proteína scFv por meio do servidor MODELLER 10.1.

```
# Loop refinement of an existing model
from modeller import *
from modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ["/home/marcel/Downloads/SARS-CoV-2"]

# Create a new class based on 'LoopModel' so that we can redefine
# select_loop_atoms (necessary)
class MyLoop(loopmodel):
      # This routine picks the residues to be refined by loop modeling
       def select_loop_atoms(self):
          # 20 residue insertion
      return selection(self.residue_range('123:', '144:'))

a = MyLoop(env,
         alnfile  = 'alinha.pir',
         knowns   = ('6W41', '2KH2'),         # initial model of the target
         sequence = 'modelo',                 # code of the target
         loop_assess_methods=assess.DOPE)
a.starting_model= 1
a.ending_model  = 50

a.loop.starting_model = 1                     # index of the first loop model
a.loop.ending_model = 2                       # index of the last loop model
a.loop.md_level = refine.slow                 # loop refinement method; this yields
                                               # use refine.slow for better models
a.repeat_optimization = 2
a.max_molpdf = 1e6


a.make()
```

A.2 *Script* utilizado no cálculo do valor de DOPE para cada modelo gerado.

```
from modeller import *
from modeller.scripts import complete_pdb
import sys

filename = sys.argv[1]

log.verbose()    # request verbose output
env = environ()
env.libs.topology.read(file='$(LIB)/top_heav.lib') # read topology
env.libs.parameters.read(file='$(LIB)/par.lib') # read parameters

# read model file
mdl = complete_pdb(env, filename)

# Assess with DOPE:
s = selection(mdl)   # all atom selection=
s.assess_dope(output='ENERGY_PROFILE NO_REPORT', file=filename[:-4] + '.profile',
              normalize_profile=True, smoothing_window=15)
```

ANEXO B - Soluções e tampões

B.1 Soluções utilizadas na minipreparação do DNA plasmidial por lise alcalina e SDS.

- Solução de lise alcalina I: 10 mL
  - glicose 0,5 M
  - Tris-HCl 1,0 M (pH 8.0)
  - EDTA 0,5 M (pH 8.0)
  - H_2O q.s.p

- Solução de lise alcalina II: 1 mL
  - NaOH 2,0 M
  - SDS 10% (m/v)
  - H_2O q.s.p

- Solução de lise alcalina III: 10 mL
  - Acetato de potássio 2,94g/5 mL
  - Ácido acético 1,2 mL
  - H_2O q.s.p

B.2 Soluções utilizadas no preparo da corrida da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v).

- TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA): Solução estoque 5X
  - Tris base 54g
  - Ácido bórico 27,5g
  - EDTA 0,5 M 20 mL (pH 8.0)

- TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA): Solução de trabalho 0,5X
  - Tris-borato 45 mM
  - EDTA 1,0 mM

- Brometo de etídeo (10mg/mL)
  - Brometo de etídeo 1g
  - H_2O 100 mL

- Tampão de amostra 6X (*Loading buffer* 6X)
  Azul de bromofenol 0,25% (m/v)
  Xileno cianol FF 0,25% (m/v)
  Glicerol 30% (v/v)

B.3 Soluções utilizadas recuperação das proteínas da fração periplasmática, fração solúvel e corpos de inclusão.

- TES (Tris-HCl-EDTA-Sacarose)
  Tris–HCl 50 mM
  EDTA 0.5 mM
  Sacarose 20%
  H_2O q.s.p
  pH 7.2

- Tampão de Lise
  Tris–HCl 50 mM
  Imidazol 10 mM
  NaCl 30 mM
  H_2O q.s.p
  pH 8.0

- Tampão de Solubilização
  Tris–HCl 50 mM
  Uréia 8,0 M
  NaCl 500 mM
  H_2O q.s.p
  pH 8.0

B.4 Soluções utilizadas no preparo da eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS

- Gel de separação 12%

  H_2O..... 3,3 mL

  Acrilamida/ Bis 30%..... 4,0 mL

  Tris 1,5 M (pH 8.8)..... 2,5 mL

  SDS 10% (m/v)..... 0,1 mL

  Persulfato de amônio 10% (m/v)..... 0,1 mL

  TEMED..... 0,004 mL

- Gel de empilhamento 5%

  H_2O..... 4,1 mL

  Acrilamida/ Bis 30%..... 1,0 mL

  Tris 1,0 M (pH 6.8)..... 0,75 mL

  SDS 10% (m/v)..... 0,06 mL

  Persulfato de amônio 10% (m/v)..... 0,06 mL

  TEMED..... 0,006 mL

- Tampão de amostra 4X (*SDS Gel-loading buffer* 4X)

  Tris-HCl 200 mM (pH 6,8)

  SDS 8,0% (m/v)

  Azul de bromofenol 0,4%

  Glicerol 40% (v/v)

  β-mercaptoetanol 400 mM

- Tampão Tris-Glicina: Solução estoque 5X

  Tris-base 15,1g

  Glicina 94g

  SDS 10% (m/v) 50 mL (pH 8.3)

- Tampão Tris-Glicina: Solução de trabalho 1X

  Tris-HCl 25 mM

  Glicina 250 mM

  SDS 0,1%

- Solução corante *Coomassie Blue*

  Coomassie Brilliant Blue R-250 2,5g

  Metanol 500 mL

  Ácido acético glacial 100 mL

  H_2O 400 mL

- Solução descorante

  Metanol 500 mL

  Ácido acético glacial 100 mL

  H_2O 400 mL

B.5 Soluções utilizadas na etapa de eletrotransferência em sistema semi-seco.

- Solução de transferência I

  Tris-base 0,3 M

  Metanol 20%

  pH 10,4

- Solução de transferência II

  Tris-base 0,025 M

  Metanol 20%

  pH 10,4

- Solução de transferência III

  Tris-base 0,025 M

  Metanol 20%

  Ácido Capróico 0,04 M

  pH 9,4.

- Solução Ponceau

  Ponceu S

  H_2O

B.6 Solução utilizada na etapa de revelação do *Western blotting*

- Solução de revelação: 10 mL

  $NiCl_2$ 0,3% 1 mL

  Tris-HCl 1M 1 pH 7.6 1 mL

  3,3'-diaminobenzidina (DAB) 10 mg

  H_2O q.s.p.

B.7 Tampões utilizados na etapa de purificação dos anticorpos recombinantes

- Tampão A

  Tris-base 50 mM
  NaCl 500 mM
  Imidazol 40 mM
  pH 7.2

- Tampão B

  Tris-base 50 mM
  NaCl 500 mM
  Imidazol 500 mM
  pH 7.2

B.8 Diálise em tampão carbonato pH 9.6

- Tampão Carbonato 20 mM

  Na_2CO_3

  $NaHCO_3$

ANEXO C - Documentos referentes ao controle de qualidade dos genes clonados disponibilizados pela empresa WatsonBio Sciences.

C.1 Documento referente ao controle de qualidade realizado para a clonagem do gene utilizado na expressão do anticorpo scFv-CR3022.

WATSONBIO
Reliability ◆ Accessibility ◆ Innovation

Tel: +1 844-WATSONBio (928-7662)
Fax: +1 832-665-2083
Contact: info@watsonbio.com
http://www.watsonbio.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Gene Name	scFv-CR3022	**Order No.**	112451-6
Lot No.	S-F10417	**Cloning Vector**	pET-27b(+)
Cloning Sites	NcoI(CCATGG)/ XhoI(CTCGAG)	**Insert Size**	806 bp
Competence	TOP10	**Vector Resistance**	Kan

QC Results

Test Items	Specifications	Results
Insert Sequence	Insert sequence results consistent with target	Pass
Vector Sequence	Flanking sequence consistent with expected	N/A
ORF Across Junction	Correct and consistent with target	N/A
Restriction Digest	Expected fragment sizes observed	N/A
PCR Amplification	Correct without non-specific bands	Pass
DNA Quantity/Quality	Actual yield (by A_{260})	5 µg
	Concentration (n/a if lyophilized)	N/A
	Purity (A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0)	Pass
	Number of Tubes	1
	Matrix	TE (lyophilized)
Endotoxin Test	Verified, <0.1 EU/µg (Endo-Free Preps Only)	N/A
Appearance	Clear, no visible particles	Pass
Label	Correct and white	Pass
Comments	Plasmids are delivered dry or in ddH_2O. Please use directly or resuspend the DNA in 20 µL autoclaved ddH_2O. If needed, 0.2 µL plasmid DNA can be used to transform *E.coli*.	

Restriction Digestion Map



Lane 1:
Plasmid

Lane 2:
Plasmid Digested with MluI/KpnI

Lane M:
DNA Marker

Certified by: Min Wong Production Supervisor

Signature: Wang Min **Date: June 19, 2020**

This product may not be resold or modified for resale without the prior written approval of Watsonbio LLC. The information provided in this data sheet is believed to be correct but does not purport to be all-inclusive and is intended to be used as a guide. Watsonbio LLC shall not be liable or responsible in any way for use of this information or the material supplied. Disposal of hazardous material may be subject to federal, state, or local laws or regulations.

For Research Use Only

CONFIDENTIAL

C.2 Documento referente ao controle de qualidade realizado para a clonagem do gene utilizado na expressão do anticorpo scFv MAD22.

WATSONBIO
Reliability • Accessibility • Innovation

Tel: +1 844-WATSONBio (928-7662)
Fax: +1 832-665-2083
Contact: info@watsonbio.com
http://www.watsonbio.com

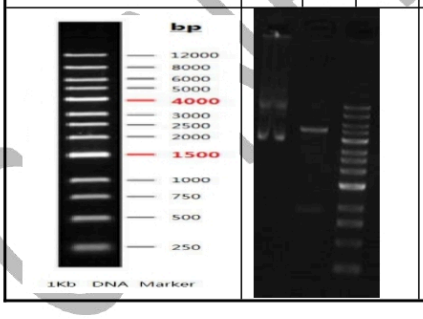
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Gene Name	scFv MAD22	**Order No.**	112451-7
Lot No.	S-F99951	**Cloning Vector**	pET-27b(+)
Cloning Sites	NcoI(CCATGG)/ XhoI(CTCGAG)	**Insert Size**	806 bp
Competence	TOP10	**Vector Resistance**	Kan

QC Results

Test Items	Specifications	Results
Insert Sequence	Insert sequence results consistent with target	Pass
Vector Sequence	Flanking sequence consistent with expected	N/A
ORF Across Junction	Correct and consistent with target	N/A
Restriction Digest	Expected fragment sizes observed	N/A
PCR Amplification	Correct without non-specific bands	Pass
DNA Quantity/Quality	Actual yield (by A_{260})	5 µg
	Concentration (n/a if lyophilized)	N/A
	Purity (A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0)	Pass
	Number of Tubes	1
	Matrix	TE (lyophilized)
Endotoxin Test	Verified, <0.1 EU/µg (Endo-Free Preps Only)	N/A
Appearance	Clear, no visible particles	Pass
Label	Correct and white	Pass
Comments	Plasmids are delivered dry or in ddH_2O. Please use directly or resuspend the DNA in 20 µL autoclaved ddH_2O. If needed, 0.2 µL plasmid DNA can be used to transform *E.coli*.	

Restriction Digestion Map



Lane 1:
Plasmid

Lane 2:
Plasmid Digested with XbaI/XhoI

Lane M:
DNA Marker

Certified by: Min Wong Production Supervisor

Signature: Wang Min **Date: June 18, 2020**

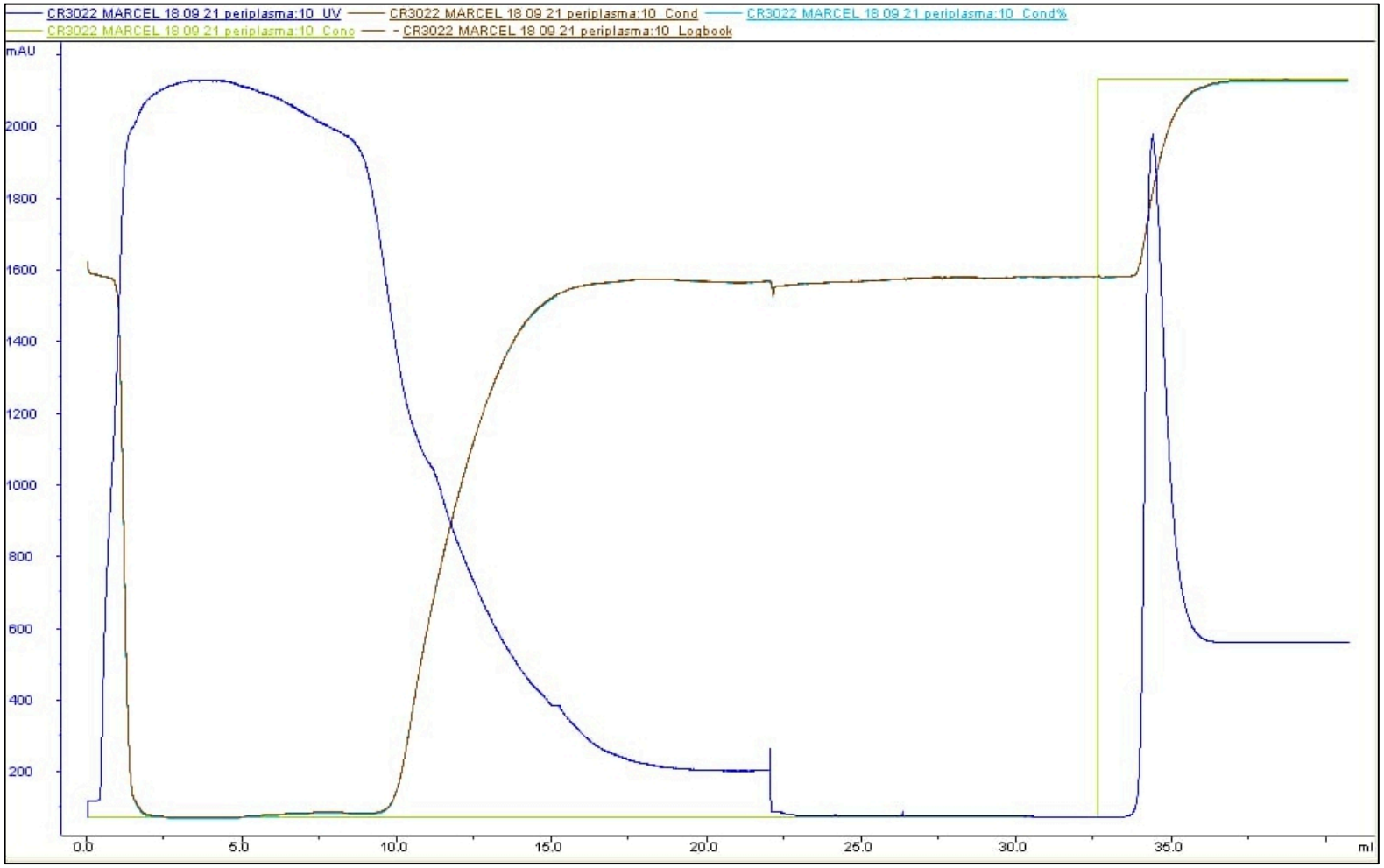
This product may not be resold or modified for resale without the prior written approval of Watsonbio LLC. The information provided in this data sheet is believed to be correct but does not purport to be all-inclusive and is intended to be used as a guide. Watsonbio LLC shall not be liable or responsible in any way for use of this information or the material supplied. Disposal of hazardous material may be subject to federal, state, or local laws or regulations.

For Research Use Only

CONFIDENTIAL

ANEXO D - Cromatogramas gerados durante a purificação dos anticorpos scFv recombinantes

D.1 Cromatograma referente a purificação do anticorpo scFv-CR3022.



D.2 Cromatograma referente a purificação do anticorpo scFv MAD22.

