

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 08/09/2024.

ANDERSON APARECIDO DO ESPIRITO SANTO

**Algoritmos genéticos aplicados ao planejamento
racional termodinâmico de anticorpos miméticos
baseados no domínio GB1 da proteína G estreptocócica:
Um estudo de simulação molecular e validação
experimental**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de doutor em Biotecnologia, sob a orienta-
ção do Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano

Araraquara

2024

S237a

Santo, Anderson Aparecido do Espírito

Algoritmos genéticos aplicados ao planejamento racional termodinâmico de anticorpos miméticos baseados no domínio GB1 da proteína G estreptocócica : um estudo de simulação molecular e validação experimental / Anderson Aparecido do Espírito Santo. -- Araraquara, 2024
135 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Gustavo Troiano Feliciano

1. Algoritmos genéticos. 2. Reconhecimento molecular. 3. Expressão gênica. 4. Computação evolutiva. 5. Dinâmica molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Neste estudo apresentamos uma nova metodologia que permite a reprogramação da estrutura e função das proteínas, projetando moléculas bioativas inteiramente originais. Esta nova abordagem redefine técnicas computacionais amplamente utilizadas na pesquisa acadêmica como agente ativo na criação de novos produtos biotecnológicos.

Potential impact of this research

In this work, we present a novel methodology that enables the reprogramming of protein structure and function, designing entirely original bioactive molecules. This new approach redefines widely used computational techniques in academic research as an active agent in the creation of new biotechnological products.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Algoritmos genéticos aplicados ao planejamento racional termodinâmico de anticorpos miméticos baseados no domínio GB1 da proteína G estreptocócica: Um estudo de simulação molecular e validação experimental

AUTOR: ANDERSON APARECIDO DO ESPIRITO SANTO

ORIENTADOR: GUSTAVO TROIANO FELICIANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **GUSTAVO TROIANO FELICIANO**
Data: 18/03/2024 07:44:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GUSTAVO TROIANO FELICIANO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química de Araraquara - Unesp

Prof. Dr. ALEXANDRE SUMAN DE ARAÚJO (Participação Virtual)
Departamento de Física / Unesp/Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. MAURÍCIO DOMINGUES COUTINHO NETO (Participação Virtual)
Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Prof. Dr. RAFAEL PLANA SIMÕES (Participação Virtual)
Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp

Prof. Dr. EUDES ETERNO FILETI (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia - UNIFESP - São José dos Campos

Araraquara, 08 de março de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Anderson Aparecido do Espírito Santo

Nome em citações bibliográficas: ESPIRITO SANTO, Anderson A.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Doutorado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(UNESP)

Instituto de Química, Campus de Araraquara

2019-2024 Tese: Algoritmos genéticos aplicados ao planejamento racional termodinâmico de anticorpos miméticos baseados no domínio GB1 da proteína G estreptocócica: Um estudo de simulação molecular e validação experimental

Orientador: Professor Dr. Gustavo Troiano Feliciano

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(UNESP)

2017-2019 Instituto de Química, Campus de Araraquara

Dissertação: Estudo sobre a variação da energia livre de ligação em complexos lectina-peroxidase através da dinâmica molecular

Orientador: Professor Dr. Gustavo Troiano Feliciano

Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares

2012-2016 Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Física de São Carlos (IFSC)

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. ESPIRITO SANTO, Anderson A.; FELICIANO, Gustavo T. Thermodynamic and structural aspects of molecular recognition in mannose-binding protein complexes: a theoretical study over hrp-artinm association. **Journal of Molecular Modeling**, v. 27, n. 4, 15 mar. 2021.
2. ESPIRITO SANTO, Anderson A.; FELICIANO, Gustavo T. Genetic Algorithms Applied to Thermodynamic Rational Design of Mimetic Antibodies Based on the GB1 Domain of Streptococcal Protein G: an atomistic simulation study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 125, n. 29, p. 7985-7996, 15 jul. 2021.
3. ESPIRITO SANTO, Anderson A.; LAZAROTI, Vitor Hugo R.; FELICIANO, Gustavo T. Multidimensional redox potential/pKa coupling in multicopper oxidases from molecular dynamics: implications for the proton transfer mechanism. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 23, n. 48, p. 27348-27354, 2021.
4. FREITAS, Luis Paulo M.; ESPIRITO SANTO, Anderson A.; LOURENÇO, Tuanan C.; SILVA, Juarez L. F. da; FELICIANO, Gustavo Troiano. Steric and Electrostatic Effects on the Diffusion of CH₄/CH₃OH in Copper-Exchanged Zeolites: insights from enhanced sampling molecular dynamics and free energy calculations. **Langmuir**, v. 37, n. 26, p. 8014-8023, 21 jun. 2021.
5. MACEDO, Lucyano J.A.; ESPIRITO SANTO, Anderson A.; SEDENHO, Graziela C.; HASSAN, Ayaz; IOST, Rodrigo M.; FELICIANO, Gustavo T.; CRESPILO, Frank N.. Three-dimensional catalysis and the efficient bioelectrocatalysis beyond surface chemistry. **Journal of Catalysis**, v. 401, p. 200-205, set. 2021.
6. MENDONÇA, João Paulo A. de; LOURENÇO, Tuanan C.; FREITAS, Luis Paulo M.; ESPIRITO SANTO, Anderson A.; FELICIANO, Gustavo T.; SILVA, Juarez L. F. da. Molecular dynamics investigation of the structural and energetic properties of CeO₂-MO_x (M = Gd, La, Ce, Zr) nanoparticles. **Materials Advances**, v. 2, n. 23, p. 7759-7772, 2021.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano, pela sua notável orientação ao longo do meu doutorado. Sua experiência, sabedoria e apoio foram fundamentais para o sucesso deste projeto. Seus ensinamentos foram inestimáveis, moldando não apenas minha pesquisa, mas também meu crescimento acadêmico e profissional.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Aline Reis e Anderson Amendola Pinheiro pela inestimável colaboração na parte experimental do meu projeto de doutorado. Sua dedicação, competência e empenho foram elementos fundamentais para o sucesso das investigações realizadas. Agradeço sinceramente por sua contribuição significativa, que não apenas enriqueceu os resultados, mas também aprimorou a qualidade e a validade dos experimentos.

Quero expressar minha profunda gratidão ao Instituto de Química da UNESP de Araraquara e a todos os seus dedicados funcionários pelo excepcional suporte que recebi ao longo do meu doutorado. Agradeço sinceramente pela infraestrutura de pesquisa de alta qualidade e pelas instalações que proporcionaram um ambiente propício ao desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa durante o período de realização deste doutorado.

Resumo

O desenvolvimento de anticorpos miméticos (AM), capazes de combinar a elevada afinidade e seletividade dos anticorpos com o pequeno tamanho dos peptídeos, tem um enorme potencial de aplicações na biotecnologia. Neste estudo, demonstramos que o projeto de AM pode ser realizado por meio de algoritmos genéticos (AG) criados a partir da combinação de *softwares* normalmente usados em simulação molecular. Nossos resultados demonstram que, usando o domínio GB1 da proteína G estreptocócica como modelo, é possível otimizar a capacidade de reconhecimento molecular de uma população de AM em poucas gerações. Nos três casos de estudo apresentados, o AG foi capaz de otimizar a energia livre de ligação (EL) das populações de AM para valores melhores do que os ligantes nativos. A convergência do AG acontece rapidamente, demonstrando que a seleção criteriosa das populações iniciais, baseada nas interações intermoleculares das superfícies dos antígenos, tem potencial de enfrentar um dos principais desafios do projeto de moléculas bioativas. Os testes experimentais imunoenzimáticos, realizados em um dos AM para avaliação da afinidade antigênica, apresentaram resultados positivos. Estes resultados comprovam que o AG foi capaz de otimizar a capacidade de reconhecimento molecular de um dos AM. Uma das consequências significativas deste estudo é a descoberta de novos motivos estruturais, que podem ser concebidos de forma original e inovadora a partir da própria estrutura de AM, dispensando a necessidade de softwares de predição estrutural e bancos de dados preexistentes. Por meio do AG desenvolvido neste estudo, demonstramos a aplicação de um novo protocolo capaz de orientar métodos experimentais no desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

Palavras-chaves: algoritmos genéticos; anticorpos miméticos; simulação molecular; energia livre de ligação.

Abstract

The development of mimetic antibodies (AM), capable of combining the high affinity and selectivity of antibodies with the small size of peptides, has enormous potential applications in biotechnology. In this study, we demonstrate that the design of AM can be achieved through genetic algorithms (AG) created from the combination of software commonly used in molecular simulation. Our results show that, using the GB1 domain of the streptococcal G protein as a model, it is possible to optimize the molecular recognition ability of a population of AM in a few generations. In the three presented case studies, the AG was able to optimize the binding free energy (EL) of the AM populations to values better than native ligands. AG convergence occurs rapidly, demonstrating that careful selection of initial populations, based on intermolecular interactions of antigen surfaces, has the potential to address one of the main challenges of bioactive molecule design. Experimental immunoenzymatic tests, conducted in one of the AM to assess antigenic affinity, yielded positive results. These results demonstrate that the AG was able to optimize the molecular recognition capability of one of the AM. One significant consequence of this study is the discovery of new structural motifs, which can be conceived in an original and innovative manner from the AM structure itself, eliminating the need for structural prediction software and preexisting databases. Through the AG developed in this study, we demonstrate the application of a new protocol capable of guiding experimental methods in the development of new bioactive molecules.

Key-words: genetic algorithms; mimetic antibodies; molecular simulation; binding free energy.

Lista de ilustrações

Figura 1 – O domínio GB1 é composto por 56 resíduos de aminoácidos que se enovelam em quatro fitas- β e uma α -hélice. As quatro fitas- β formam uma enorme área de superfície com pelo menos 15 aminoácidos (Em destaque na ilustração) que podem ser modificados para modelagem de um AM.	21
Figura 2 – Ilustração dos epítomos alvos dos AM. A) Receptor tirosina quinase (VEGFR) (PDB ID: 1FLT). B) Envelope viral HC-E2 (PDB ID: 5KZP). C) Domínio RBD (PDB ID: 7BZ5).	23
Figura 3 – Ilustração do complexo formado pelas estruturas dos peptídeos GB1 e VEGFR após a minimização da energia do campo de força Amber.	28
Figura 4 – Ilustração da estrutura do molde PDB da superfície do VEGFR. As regiões em vermelho e azul são aceptoras de ligação de hidrogênio. As regiões em branco são doadoras de ligação de hidrogênio. As regiões em ciano são hidrofóbicas.	30
Figura 5 – Ilustração do complexo formado pela estrutura do GB1 e o molde VEGFR utilizado pela função de pontuação.	30
Figura 6 – Ilustração da estrutura do mutante mGB1-1 melhor classificado na função de pontuação do rotâmeros para VEGFR. Os resíduos são projetados com seus rotâmeros na direção de maior pontuação.	31
Figura 7 – Ilustração do cruzamento inicial realizado pelo AG. Os dois pares de fitas- β de dois mutantes são trocados resultando em dois novos mutantes filhos.	33
Figura 8 – Fluxograma representando a metodologia completa utilizada no AG.	35
Figura 9 – Representação da ordenação dos resíduos conforme a função de pontuação para o antígeno VEGFR.	36
Figura 10 – Representação da ordenação dos resíduos conforme a função de pontuação para o antígeno HC-E2.	37
Figura 11 – Representação da ordenação dos resíduos conforme a função de pontuação para o antígeno RBD.	38
Figura 12 – Ilustração mostrando o sistema base para a DM no projeto de AM. A) Sistema formado pelo VEGFR e o VEGF. B) Sistema base formado pelo GB1 e o VEGFR.	39
Figura 13 – Ilustração da conformação final dos mutantes mGB1 da população inicial do AG após 100ns em cada DM.	40

Figura 14 – Energias calculadas em todas as gerações do AG para o sistema VEGFR. O critério de convergência é a EL entre o VEGF e o receptor VEGFR.	41
Figura 15 – Desvio padrão da energia calculada para o VEGFR, utilizado como critério de convergência, e a energia do mutante de melhor energia mGB1-11.	45
Figura 16 – Contribuições individuais dos resíduos do mutante mGB1-11 na EL total.	46
Figura 17 – Ilustração mostrando o sistema base para a DM no projeto de AM. A) Sistema formado pelo fragmento Fab do anticorpo e o envelope HC-E2. B) Sistema base formado pelo GB1 e o envelope HC-E2.	47
Figura 18 – Energias calculadas em todas as gerações do AG para o sistema HC-E2. O critério de convergência é a EL entre o Grupo Fab do anticorpo e o peptídeo HC-E2.	48
Figura 19 – Desvio padrão da energia calculada para o HC-E2, utilizado como critério de convergência, e a energia do mutante de melhor energia HCmGB1-81.	49
Figura 20 – Contribuições individuais dos resíduos do mutante HCmGB1-81 na EL total.	50
Figura 21 – Ilustração da região do domínio RBD (Azul) neutralizada por anticorpos. A) Estrutura do anticorpo B38 (vermelho) neutralizando a região de reconhecimento ACE2. B) Estrutura do domínio GB1 (vermelho) na região de otimização do sistema base.	51
Figura 22 – Energias calculadas em todas as gerações do AG para o sistema RBD. O critério de convergência é a EL entre o fragmento Fab do anticorpo B38 e o Domínio RBD da proteína spike.	52
Figura 23 – Desvio padrão da energia calculada para o RBD, utilizado como critério de convergência, e as energias do mutante de melhor energia SGB1-121.	54
Figura 24 – Valores da EL dos mutantes SGB1-121 _{MD} e SGB1-121 _{his-tag} com adição do termo entrópico dos modos normais de vibração.	55
Figura 25 – Contribuições individuais dos resíduos do mutante SGB1-121 na EL total.	56
Figura 26 – Ilustração da previsão estrutural da ferramenta de MH. Valores de QMEAN próximos a zero indicam grande similaridade com estruturas experimentais.	57
Figura 27 – Ilustração do modelo de ancoragem molecular realizado pelo servidor online HDOCK.	58

Figura 28 – Ilustração da sobreposição dos <i>frames</i> durante 10 ns finais das DMs do mutante SGB1-121. A) Sobreposição dos <i>frames</i> da trajetória do mutante SGB1-121 _{MD} . B) Sobreposição dos <i>frames</i> da trajetória do mutante SGB1-121 _{his-tag}	59
Figura 29 – Análise estrutural de todos os mutantes SGB1-121. A) Gráfico de RMSD dos mutantes com e sem his-tag. B) Gráfico de RMSF dos mutantes com e sem his-tag.	60
Figura 30 – Análise estrutural da estrutura secundária do mutante SGB1-121 durante a DM de 100 ns.	61
Figura 31 – Ilustração da sobreposição dos <i>frames</i> da trajetória de DM do mutante SGB1-121 _{MD} . Moléculas de água são coloridas em vermelho no interior do arcabouço proteico.	62
Figura 32 – Gráfico mostrando o espectro de dicroísmo circular das soluções contendo GB1-Ref e SGB1-121 (diluídas 150 vezes), com a previsão teórica fornecida pelo servidor online PDBMD2CD.	64
Figura 33 – Gráfico mostrando a porcentagem de inibição do extrato bruto não purificado de <i>E. Coli</i> e dos extratos purificados contendo GB1-Ref e SGB1-121. Valores acima de 30% são considerados positivos para inibição.	66
Figura 34 – Script shell usado na função de pontuação.	121
Figura 35 – Script shell usado para gerar a população inicial de mutantes do AG.	122
Figura 36 – Script shell usado para gerar a população de mutantes do AG.	123
Figura 37 – Script shell usado na DM do algoritmo genético.	124

Lista de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros usados na calibração da função de pontuação de rotâmeros.	78
Tabela 2 – Ordem dos resíduos de aminoácidos mais bem classificados em cada posição na função de pontuação do rotâmeros	78
Tabela 3 – Validação Experimental do AG. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	79
Tabela 4 – Primeira geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	83
Tabela 5 – Mutantes filhos da primeira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	83
Tabela 6 – Segunda geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	84
Tabela 7 – Mutantes filhos da segunda geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	84
Tabela 8 – Terceira geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	85
Tabela 9 – Mutantes filhos da terceira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	85
Tabela 10 – Quarta geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	86
Tabela 11 – Mutantes filhos da quarta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	86
Tabela 12 – Quinta geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	87
Tabela 13 – Mutantes filhos da quinta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	87
Tabela 14 – Sexta geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	88
Tabela 15 – Mutantes filhos da sexta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	88
Tabela 16 – Sétima geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	89
Tabela 17 – Mutantes filhos da sétima geração de AM. A Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	89

Tabela 18 – Oitava geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	90
Tabela 19 – Mutantes filhos da oitava geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	90
Tabela 20 – Nona geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	91
Tabela 21 – Mutantes filhos da nona geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	91
Tabela 22 – Décima geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	92
Tabela 23 – Mutantes filhos da décima geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	92
Tabela 24 – Décima primeira geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	93
Tabela 25 – Mutantes filhos da décima primeira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	93
Tabela 26 – Décima segunda geração de AM anti-FLT-1 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	94
Tabela 27 – Primeira geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	95
Tabela 28 – Mutantes filhos da primeira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	95
Tabela 29 – Segunda geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	96
Tabela 30 – Mutantes filhos da segunda geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	96
Tabela 31 – Terceira geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	97
Tabela 32 – Mutantes filhos da terceira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	97
Tabela 33 – Quarta geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	98
Tabela 34 – Mutantes filhos da quarta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	98
Tabela 35 – Quinta geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	99
Tabela 36 – Mutantes filhos da quinta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	99

Tabela 37 – Sexta geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	100
Tabela 38 – Mutantes filhos da sexta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	100
Tabela 39 – Sétima geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	101
Tabela 40 – Mutantes filhos da sétima geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	101
Tabela 41 – Oitava geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	102
Tabela 42 – Mutantes filhos da oitava geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	102
Tabela 43 – Nona geração de AM anti-HC-E2 mGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	103
Tabela 44 – Primeira geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	104
Tabela 45 – Mutantes filhos da primeira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	104
Tabela 46 – Segunda geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	105
Tabela 47 – Mutantes filhos da segunda geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	105
Tabela 48 – Terceira geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	106
Tabela 49 – Mutantes filhos da terceira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	106
Tabela 50 – Quarta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	107
Tabela 51 – Mutantes filhos da quarta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	107
Tabela 52 – Quinta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	108
Tabela 53 – Mutantes filhos da quinta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	108
Tabela 54 – Sexta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	109
Tabela 55 – Mutantes filhos da sexta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	109

Tabela 56 – Sétima geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	110
Tabela 57 – Mutantes filhos da sétima geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	110
Tabela 58 – Oitava geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	111
Tabela 59 – Mutantes filhos da oitava geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	111
Tabela 60 – Nona geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	112
Tabela 61 – Mutantes filhos da nona geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	112
Tabela 62 – Décima geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	113
Tabela 63 – Mutantes filhos da Décima geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	113
Tabela 64 – Décima primeira geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	114
Tabela 65 – Mutantes filhos da Décima primeira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	114
Tabela 66 – Décima segunda geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	115
Tabela 67 – Mutantes filhos da Décima segunda geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	115
Tabela 68 – Décima terceira geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	116
Tabela 69 – Mutantes filhos da Décima terceira geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	116
Tabela 70 – Décima quarta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	117
Tabela 71 – Mutantes filhos da Décima quarta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	117
Tabela 72 – Décima quinta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	118
Tabela 73 – Mutantes filhos da Décima quinta geração de AM. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	118
Tabela 74 – Décima sexta geração de AM anti-RBD SGB1. Todos os valores de ΔG estão em quilocaloria por mol.	119

Lista de abreviaturas e siglas

AG	Algoritmo genético
AM	Anticorpos miméticos
CDR	Regiões determinantes complementares
EL	Energia livre de ligação
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Região do fragmento cristalizável
HC	Hepatite C
MH	Modelagem por homologia
DM	Dinâmica molecular
MM-GBSA	Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area
RMSD	Raiz quadrada do desvio quadrático médio
RMSF	Raiz quadrada da flutuação quadrática média
VEGF	Fator de crescimento vascular
VEGFR	Receptor tirosina quinase do tipo VEGF-FMS

Lista de símbolos

α	Letra grega minúscula Alfa
β	Letra grega minúscula Beta
γ	Letra grega minúscula Gama
Δ	Letra grega maiúscula Delta
ϵ	Letra grega minúscula Epsilon
θ	Letra grega minúscula Theta
μ	Letra grega minúscula Mi
π	Letra grega minúscula Pi
ω	Letra grega minúscula Omega

Sumário

1	Introdução	20
2	Objetivos	25
3	Metodologia	26
3.1	<i>Softwares</i> usados	26
3.2	Campo de força	26
3.3	MM-GBSA	27
3.4	Construção do sistema base	28
3.5	Função de pontuação	29
3.6	Dinâmica molecular	32
3.7	Algoritmo Genético	32
3.8	Síntese e expressão	33
3.9	Dicroísmo circular	34
3.10	Deteção de anticorpos	34
4	Resultados	36
4.1	Função de pontuação	36
4.2	Algoritmo genético do sistema VEGF	39
4.2.1	Análise do desvio padrão mGB1-11	45
4.2.2	Decomposição de energia do mGB1-11	46
4.3	Algoritmo genético do sistema HC-E2	47
4.3.1	Análise do desvio padrão HC-mGB1-81	49
4.3.2	Decomposição de energia do mutante HCmGB1-81	50
4.4	Algoritmo genético do sistema RBD	51
4.4.1	Análise do desvio padrão SGB1-121	54
4.4.2	Análise de termos entrópicos	55
4.4.3	Decomposição de energia do mutante SGB1-121	56
4.4.4	Modelagem por homologia SGB1-121	57
4.4.5	Teste de ancoragem molecular	58
4.4.6	Teste de His-tag	59
4.4.7	Análise da estabilidade estrutural	60
4.4.8	Análise de estrutura secundária	61
4.4.9	Moléculas estruturais de água	62
5	Síntese e validação experimental	63
5.1	Análise de dicroísmo circular	64
5.2	Avaliação de afinidade antigênica	66
6	Observações gerais	67

7	Conclusão	70
	Referências	71
	APÊNDICE A – PARÂMETROS DA FUNÇÃO DE PONTUAÇÃO . .	78
	APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DO AG	79
	APÊNDICE C – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	80
	APÊNDICE D – ENERGIAS DO AG PARA OS MUTANTES MGB1 ANTI-FLT-1	83
	APÊNDICE E – ENERGIAS DO AG PARA OS MUTANTES MGB1 ANTI-HC-E2	95
	APÊNDICE F – ENERGIAS DO AG PARA OS MUTANTES SGB1 ANTI-RBD	104
	APÊNDICE G – ARQUIVOS DE TRAJETÓRIAS SGB1-121	120
	APÊNDICE H – CÓDIGOS USADOS PELO AG	121

1 Introdução

No cenário atual, com o surgimento de novas doenças e epidemias, novas estratégias são necessárias para otimizar o desenvolvimento de moléculas bioativas. Nesse contexto, as terapias baseadas em anticorpos são uma das abordagens mais bem-sucedidas (Lu *et al.*, 2020), devido à sua formidável capacidade de reconhecimento molecular. Essa propriedade é modulada pelas alças variáveis nas Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR), localizadas no fragmento de ligação ao antígeno (Fab), dentro das cadeias leve e pesada dos anticorpos (Nelson; Cox, 2014). Ademais, os anticorpos têm a capacidade de ativar a resposta imune por meio de marcadores de opsonina presentes na região do fragmento cristalizável (Fc). Do ponto de vista farmacodinâmico, os anticorpos são o agente terapêutico ideal, capazes de neutralizar um único antígeno, evitando problemas de efeitos colaterais comuns em medicamentos, devido à baixa seletividade. No entanto, encontrar um anticorpo relacionado a cada doença é uma das tarefas mais desafiadoras (Scott; Wolchok; Old, 2012). Além disso, os altos custos de pesquisa e desenvolvimento tornam as terapias baseadas em anticorpos extremamente caras.

Nessa perspectiva, os pesquisadores buscam descobrir moléculas mais simples que possam reproduzir, ainda que parcialmente, as propriedades dos anticorpos, dentre as quais, destacam-se os anticorpos miméticos (AM). A principal característica de um AM é a existência de uma região constante, que estabiliza o enovelamento, e de regiões variáveis, que medeiam a capacidade de reconhecimento molecular (Simeon; Chen, 2017). Embora os AM sejam incapazes de estimular respostas imunes, eles podem reproduzir a capacidade de neutralização dos anticorpos, ligando-se fortemente aos antígenos. Devido à sua maior simplicidade e origem peptídica, os AM são muito mais fáceis de sintetizar e armazenar, não necessitando de uma rota sintética completamente diferente para cada nova molécula, como as moléculas de fármacos tradicionais (Bruce; Ta; Mcnaughton, 2016). Além disso, os AM se adaptam melhor a diferentes organismos e possuem maior penetrabilidade que os anticorpos convencionais.

Um dos casos de maior sucesso na engenharia de anticorpos miméticos são os *affibodies* baseados no domínio Z da proteína A, cuja estrutura é suficientemente estável para modular a capacidade de reconhecimento molecular através da randomização de 13 aminoácidos (Frejd; Kim, 2017). Analogamente aos *affibodies*, a estrutura do domínio B1 da proteína G estreptocócica (GB1) (PDB ID: 3GB1) é conhecida na literatura por sua alta estabilidade frente a mudanças de aminoácidos (Voet; Voet, 2013, p. 282). Devido às suas propriedades, o GB1 já serviu de base para o desenvolvimento de uma metaloproteína artificial (Bozkurt *et. al*, 2018) e como modelo para estudar a

compatibilidade estérica de ligação entre proteínas (Nerattini *et al.*, 2018).

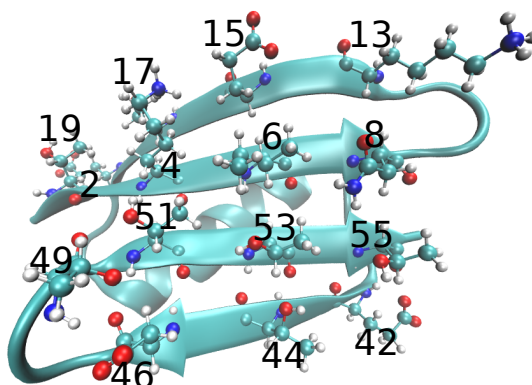


Figura 1 – O domínio GB1 é composto por 56 resíduos de aminoácidos que se enovelam em quatro fitas- β e uma α -hélice. As quatro fitas- β formam uma enorme área de superfície com pelo menos 15 aminoácidos (Em destaque na ilustração) que podem ser modificados para modelagem de um AM.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Como pode ser visto na Figura 1, o domínio GB1 é composto por 56 resíduos de aminoácidos, com uma estrutura tridimensional muito bem definida, que se enovela em quatro fitas- β e uma α -hélice. Essa estrutura confere ao domínio GB1 as características de uma proteína globular, onde as quatro fitas- β formam uma área superficial exposta na qual os resíduos 2, 4, 6, 8, 13, 15, 17, 19, 42, 44, 46, 49, 51, 53 e 55 podem ser modificados para mediar a capacidade de reconhecimento molecular (Espírito Santo; Feliciano, 2021b). Todas essas propriedades fazem do domínio GB1 um candidato ideal para uma prova de conceito no desenvolvimento de AM.

A escolha dos candidatos a antígeno para um AM deve levar em consideração o tamanho e a estabilidade molecular. Diante disso, o mapeamento de epítomos é considerado uma etapa crucial no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos (Ladner, 2007), pois identifica as menores porções de antígenos capazes de gerar a resposta imune. Isso é resultado da capacidade desses epítomos de manter a integridade estrutural, mesmo quando dissociadas da estrutura principal da proteína.

Neste caso, o receptor tirosina quinase do tipo VEGF-FMS (VEGFR), um indutor angiogênico em organismos vivos, composto por sete domínios de imunoglobulina (Wiesmann *et al.*, 1997), é uma excelente opção de antígeno para o projeto de AM. Como pode ser visto pela resolução da estrutura cristalográfica (PDB ID: 1FLT), o segundo domínio do VEGFR mostrado na Figura 2A é responsável pela ligação ao fator de crescimento vascular (VEGF). A neutralização do VEGF foi um dos casos de maior sucesso na redução da mortalidade de pacientes com câncer em terapias com anticorpos monoclonais (Ellis; Hicklin, 2008). No entanto, são necessários dois

anticorpos para neutralizar cada VEGF. Portanto, o desenvolvimento de AM capazes de neutralizar o VEGFR teria um enorme potencial para auxiliar na terapia do câncer.

Ademais, as doenças virais, como a Hepatite C (HC) e a síndrome respiratória aguda grave (COVID-19), também são alvo de grande interesse no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. Ressalta-se que, apesar dos avanços na medicina e introdução de novos fármacos, a HC ainda é uma das doenças virais mais graves em todo o mundo (Geller *et al.*, 2016). Isto se deve principalmente à grande mutabilidade deste vírus, o que dificulta a produção de vacinas eficazes. Neste caso, a utilização de epítomos, como o envelope viral HC-E2 (PDB ID: 5KZP), é suficiente para induzir uma resposta imunitária eficaz. Como pode ser visto na Figura 2B, o envelope HC-E2 pode ser sintetizado na forma do peptídeo defensina cíclica. Este epítopo é formado por apenas 15 resíduos de aminoácidos, os quais constituem duas fitas- β estabilizadas por ligações de dissulfeto em suas extremidades (Pierce *et al.*, (2017). Apesar de seu tamanho extremamente pequeno, ainda é grande o suficiente para ser reconhecido por anticorpos, tornando-o um potencial alvo para o projeto de AM.

Concomitantemente, a COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, disseminou-se pelo mundo nos últimos anos, gerando milhares de vítimas (Chen; LI, 2020). Esse vírus tem uma rota de contaminação muito bem estudada, através do conhecimento vindo de outros vírus da mesma linhagem. Atualmente, sabe-se que esse vírus utiliza proteínas spike, presentes em sua superfície (Olukitibi *et al.*, 2023). Essa proteína é composta por duas subunidades S1 e S2 que ligam-se ao domínio peptidase do receptor ACE2 em células humanas. Esse receptor é responsável pela fusão das membranas celulares, atuando como porta de entrada do vírus nas células. O reconhecimento molecular ocorre quando a α -hélice do receptor ACE2 se liga ao domínio RBD da proteína spike (Cao *et al.*, 2020). Devido à sua importância na ligação vírus-célula, o epítopo RBD mostrado na Figura 2C representa um alvo promissor no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos e vacinas contra o vírus. Sabe-se que a neutralização do domínio RBD por anticorpos bloqueia a capacidade do vírus de se ligar ao domínio ACE2 e, conseqüentemente, impede a sua replicação (Shuaib *et al.*, 2023). O conhecimento deste ciclo resulta que a maioria das vacinas desenvolvidas em todo o mundo são concebidas para estimular respostas imunitárias à proteína spike.

Na Figura 2 podemos ver ilustrações das estruturas dos antígenos propostos como possíveis alvos para o projeto de AM. Neste caso, é evidente que o VEGFR e o HC-E2 apresentam tamanhos significativamente reduzidos em comparação com o RBD. Nos três casos, os antígenos são formados apenas por resíduos de aminoácidos, sem modificações pós-traducionais, mas com presença de algumas ligações dissulfeto, que auxiliam os epítomos a manter sua estabilidade estrutural. Além disso, todos os modelos propostos têm suas estruturas muito bem definidas experimentalmente através

da cristalografia de raios-X, o que reduz a incerteza sobre possíveis conformações em modelos puramente teóricos.

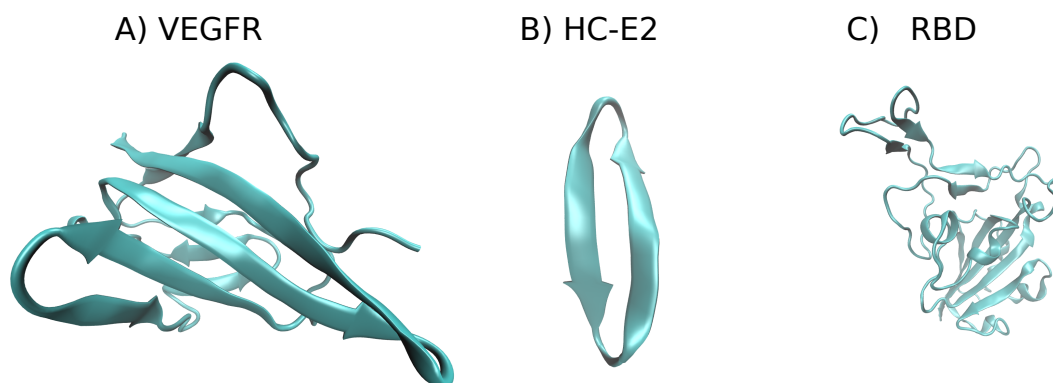


Figura 2 – Ilustração dos epítomos alvos dos AM. A) Receptor tirosina quinase (VEGFR) (PDB ID: 1FLT). B) Envelope viral HC-E2 (PDB ID: 5KZP). C) Domínio RBD (PDB ID: 7BZ5).

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Nos casos especiais, quando existem bancos de dados de moléculas com atividade biológica conhecida, o projeto de novos AM pode ser baseado no estudo de mutações sitio-dirigidas (Valiente *et al.*, 2021) e transplantes de motivos estruturais (Kadonosono *et al.*, 2020), que visam a transferência e aprimoramento da capacidade de reconhecimento molecular. Essa tarefa pode ser realizada com uso de ferramentas computacionais. *Softwares*, como o Rosetta, usam bancos de dados estruturais para otimizar a capacidade de reconhecimento molecular de anticorpos (Adolf-Bryfogle *et al.*, 2018), mas a grande variabilidade das CDR tornam esse projeto um grande desafio. Na ausência de bancos de dados, esse problema pode ganhar dimensões imensuráveis. Apenas com 15 resíduos de aminoácidos da superfície do GB1 haveria um número gigantesco de combinações e regiões de reconhecimento molecular, impossibilitando a triagem de todas as possibilidades. No entanto, as interações intermoleculares que as cadeias laterais dos aminoácidos podem fazer são bem conhecidas. Além disso, o reconhecimento molecular não é um problema de uma única solução, pois existem muitos resíduos de aminoácidos com propriedades semelhantes (Gellman, 1997). Muitas combinações de aminoácidos podem ser soluções indistinguíveis de energia, capazes de desempenhar a mesma função de reconhecimento molecular.

Com base nesses princípios, as informações sobre a área superficial dos antígenos podem ser utilizadas para selecionar os resíduos com maior afinidade, modelando ligantes específicos para esta região, reduzindo o problema a dezenas de milhares de moléculas (Hunt *et al.*, 2022). Além disso, devido às inúmeras fases de desenvolvimento, desde a pesquisa experimental até ao produto final, onde moléculas com maior potencial avançam para fases posteriores, o projeto de moléculas bioativas pode ser visto essencialmente como um problema de evolução e seleção natural. Todas essas suposições podem servir de base para abordagens mais eficientes, que evitem a

necessidade de testar todas as combinações de aminoácidos possíveis, capazes de projetar racionalmente novas moléculas bioativas. Nessa situação, quando precisamos de soluções aproximadas para um problema multidimensional, podemos usar algoritmos genéticos para otimizar as propriedades de moléculas (Bozkurt et. al, 2014). Os AG são inspirados na biologia evolutiva, como hereditariedade, mutação, seleção natural e crossing over. *Softwares*, como o AutoGrow4 (Spiegel; Durrant, 2020), são capazes de usar a técnica de AG, em conjunto com modelos gerados por funções de pontuação de ancoragem molecular, para projetar novas moléculas. Contudo, essa metodologia é limitada a um banco de dados contendo algumas dezenas de pequenas moléculas. Além disso, ferramentas de ancoragem molecular geram modelos naturalmente direcionados para regiões com melhor afinidade.

Tendo em vista as limitações das técnicas usadas atualmente, uma nova abordagem de AG, que faça uso da dinâmica molecular (DM), poderia abrir um novo horizonte no planejamento de AM. A técnica de DM baseia-se na resolução numérica das equações do movimento de um sistema de moléculas (Hollingsworth; Dror, 2018). Essa abordagem permite explorar melhor o espectro conformacional das moléculas, revelando as conformações prováveis, onde o reconhecimento molecular pode ocorrer espontaneamente dentro do tempo de simulação. Aliado a DM, podemos utilizar o método *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA), popular para estimar a energia livre de ligação (EL). Esse método tem a capacidade de priorizar variedades de soluções no projeto de moléculas bioativas, atuando como um filtro de triagem virtual para bancos de dados muito grandes (Gupta; Chaudhary; Aparoy, 2018), facilitando estudos de descoberta de novos fármacos.

Dentro do contexto geral, este estudo procurou investigar uma nova abordagem computacional que combina DM e MM-GBSA em um algoritmo de busca e otimização, visando transformar o GB1 em um AM para os antígenos selecionados (Espírito Santo; Feliciano, 2021b). Como os AM gerados nesta abordagem são o resultado de um modelo baseado em uma representação simplificada, com várias aproximações usadas para viabilizar simulações de DM, eles precisam ser submetidos à validação experimental. Esta validação, baseada em testes de expressão gênica, análise estrutural e afinidade antigênica, é necessária para comprovar as propriedades para as quais foram concebidos. A proposta desenvolvida neste estudo visa repensar a aplicabilidade de técnicas amplamente utilizadas na pesquisa acadêmica, redefinindo-as não apenas como ferramentas para analisar sistemas biológicos mais complexos, mas como agentes ativos em sua transformação. Demonstra-se que essa transformação pode ser realizada através da reprogramação de funções biológicas, permitindo, assim, a criação de novos produtos biotecnológicos.

7 Conclusão

Neste estudo, apresentamos uma abordagem demonstrando que a modelagem de AM pode ser efetuada utilizando uma combinação de *softwares* amplamente empregados em simulação molecular. Esses *softwares*, quando estruturados sob forma de um AG, podem redefinir o papel do domínio GB1. Tal reconfiguração, alcançada através da reprogramação da sua estrutura e função, possui um potencial significativo para orientar a pesquisa experimental por novas moléculas bioativas. A execução do AG é viável computacionalmente devido à escolha de um arcabouço para AM e epítomos antigênicos com dimensões extremamente pequenos, mas capazes de manter a estabilidade estrutural.

Mostramos que, a partir de bases de dados confiáveis da superfície de um antígeno, usando uma função de pontuação muito simples, o AG pode otimizar a capacidade de reconhecimento molecular de populações de AM em poucas gerações. Nos três casos de estudo apresentados, o AG foi capaz de otimizar a EL das populações de AM para valores melhores do que os ligantes nativos. Essa otimização acontece muito rapidamente, comprovando que a escolha racional das populações iniciais tem potencial de resolver um dos grandes problemas do projeto de moléculas bioativas.

Os resultados computacionais indicam que, utilizando a metodologia empregada neste estudo, é possível desenvolver motivos estruturais capazes de reconhecer antígenos. Esses motivos estruturais podem ser projetados a partir da própria estrutura dos AM, de forma original e inovadora, sem necessidade de *softwares* de predição estrutural, ancoragem molecular ou bancos de dados preexistentes. Os mutantes gerados conciliam a alta estabilidade do GB1 com as propriedades otimizadas dos AM. Portanto, podemos afirmar que o objetivo de desenvolver uma base peptídica estável para conversão em AM foi atingido.

Os testes experimentais de afinidade antigênica mostraram um resultado positivo, confirmando que o anticorpo SGB1-121 foi capaz de neutralizar o antígeno RBD para o qual foi projetado. Esses resultados ainda não são definitivos, demandando novos experimentos com diferentes concentrações. Contudo, a viabilidade da metodologia utilizada neste estudo é evidente. Todos os procedimentos podem ser concluídos em períodos significativamente mais curtos do que a busca convencional em extensas bases de dados de moléculas bioativas. Consequentemente, podemos afirmar que a fase de validação experimental produziu resultados satisfatórios, demonstrando que os objetivos deste estudo foram alcançados.

Referências

- 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**, v. 14, n. 4, p. 1006112, 27 abr. 2018.
- ARYA, Namrata; KAUR, Arminder. Molecular Docking: a review paper. **International Journal of Innovative Research in Engineering Management**, p. 140-146, 1 fev. 2022.
- BAROZZI, Annalisa; LAVOIE, Ashton; DAY, Kevin N.; PRODRUMOU, Raphael; MENEGATTI, Stefano. Affibody-Binding Ligands. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3769, 27 maio 2020.
- BOZKURT, Esra; ASHARI, Negar; BROWNING, Nicholas; BRUNK, Elizabeth; CAMPOMANESA, Pablo; PEREZ, Marta A. S.; ROTHLSBERGER, Ursula. Lessons from Nature: computational design of biomimetic compounds and processes. **Chimia**, v. 68, n. 9, p. 642, 24 set. 2014.
- BOZKURT, Esra; PEREZ, Marta A. S.; HOVIUS, Ruud; BROWNING, Nicholas J.; ROTHLSBERGER, Ursula. Genetic Algorithm Based Design and Experimental Characterization of a Highly Thermostable Metalloprotein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 13, p. 4517-4521, 16 jan. 2018.
- BRUCE, Virginia J.; TA, Angeline N.; MCNAUGHTON, Brian R. Minimalist Antibodies and Mimetics: an update and recent applications. **Chembiochem**, v. 17, n. 20, p. 1892-1899, 4 set. 2016.
- CAO, Longxing; GORESHNIK, Inna; COVENTRY, Brian; CASE, James Brett; MILLER, Lauren; KOZODOY, Lisa; CHEN, Rita E.; CARTER, Lauren; WALLS, Alexandra C.; PARK, Young-Jun. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. **Science**, v. 370, n. 6515, p. 426-431, 23 out. 2020.
- CASE, David A.; BROZELL, Scott R.; BEN-SHALOM, Ido Y.; CERUTTI, David; CHEATHAM, Thomas E.; CRUZEIRO, Vinícius W. D.; DARDEN, TOM; DUKE, Robert E.; GHOREISHI, Delaram; GILSON, MIKE; GOHLKE, Holger; Goetz, Andreas W.; GREENE, D'Artagnan; HARRIS, Robert; HOMEYER, Nadine; Huang, Yandong; IZADI, Saeed; KOVALENKO, Andriy; KURTZMAN, Tom; LEE, Taisung; LEGRAND, Scott; LI, Pengfei; LIN, Charles; LIU, Jian; LUCHKO, Tyler; LUO, Ray; MERMELSTEIN, Daniel J.; MERZ, Kenneth M.; MIAO, Yinglong; MONARD, Gérald; NGUYEN, Hai; OMELIAN, IGOR; ONUFRIEV, Alexey; PAN, Feng;

SALOMON-FERRER, Romelia; SWAILS, Jason; WALKER, Ross C.; WANG, Junmei; WEI, Haixin; WOLF, Romain M.; WU, Xiongwu; XIAO, Li; YORK, Darrin; KOLLMAN, Peter. **Amber 2018**. versão 2018. University of California: San Francisco, 2018.

CHAUHAN, Varun M.; PANTAZES, Robert J. MutDock: a computational docking approach for fixed-backbone protein scaffold design. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 29 ago. 2022.

CHEN, Yu; LI, Lanjuan. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 515-516, maio 2020.

CHEN, Yu; ZHENG, Yongxiang; FONG, Pedro; MAO, Shengjun; WANG, Qiantao. The application of the MM/GBSA method in the binding pose prediction of FGFR inhibitors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 17, p. 9656-9663, 2020.

CONWAY, Patrick; TYKA, Michael D.; DIMAIO, Frank; KONERDING, David E.; BAKER, David. Relaxation of backbone bond geometry improves protein energy landscape modeling. **Protein Science**, v. 23, n. 1, p. 47-55, 22 nov. 2013.

DELANO, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*. Versão 2.5. DeLano Scientific: Palo Alto, 2002.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal Of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, fev. 1996.

DREW, Elliot D; JANES, Robert W. PDBMD2CD: providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 28 abr. 2020.

ELLIS, Lee M.; HICKLIN, Daniel J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 579-591, 3 jul. 2008.

ESPIRITO SANTO, Anderson A.; FELICIANO, Gustavo T. Thermodynamic and structural aspects of molecular recognition in mannose-binding protein complexes: a theoretical study over hrp-artinm association. **Journal of Molecular Modeling**, v. 27, n. 4, 15 mar. 2021.

ESPIRITO SANTO, Anderson A.; FELICIANO, Gustavo T. Genetic Algorithms Applied to Thermodynamic Rational Design of Mimetic Antibodies Based on the GB1 Domain of Streptococcal Protein G: an atomistic simulation study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 125, n. 29, p. 7985-7996, 15 jul. 2021.

FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. New York: Kluwer Academic/Plenum, 1996. 738 p.

FREJD, Fredrik y; KIM, Kyu-Tae. Affibody molecules as engineered protein drugs. **Experimental Molecular Medicine**, v. 49, n. 3, p. 306, mar. 2017.

- GELLER, Ron; ESTADA, Úrsula; PERIS, Joan B.; ANDREU, Iván; BOU, Juan-Vicente; GARIJO, Raquel; CUEVAS, José M.; SABARIEGOS, Rosario; MAS, Antonio; SANJUÁN, Rafael. Highly heterogeneous mutation rates in the hepatitis C virus genome. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 7, n.p , 18 abr. 2016.
- GENHEDEN, Samuel; KUHN, Oliver; MIKULSKIS, Paulius; HOFFMANN, Daniel; RYDE, Ulf. The Normal-Mode Entropy in the MM/GBSA Method: effect of system truncation, buffer region, and dielectric constant. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 8, p. 2079-2088, 2 ago. 2012.
- GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2 abr. 2015.
- GREEN, Michael R., SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th Ed., Vol. II, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 2028 p.
- GUPTA, Ashish; CHAUDHARY, Neha; APAROY, Polamarasetty. MM-PBSA and per-residue decomposition energy studies on 7-Phenyl-imidazoquinolin-4(5H)-one derivatives: identification of crucial site points at microsomal prostaglandin e synthase-1 (mpges-1) active site. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 352-359, nov. 2018.
- GELLMAN, Samuel H . Introduction: molecular recognition. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 5, p. 1231-1232, 1 ago. 1997.
- HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O . Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, set. 2018.
- HOU, Tingjun; WANG, Junmei; LI, Youyong; WANG, Wei. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69-82, 30 nov. 2010.
- HUANG, Sheng-You; GRINTER, Sam Z.; ZOU, Xiaoqin. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899, 2010.
- HUNT, Andrew C.; CASE, James Brett; PARK, Young-Jun; CAO, Longxing; WU, Kejia; WALLS, Alexandra C.; LIU, Zhuoming; BOWEN, John E.; YEH, Hsien-Wei; SAINI, Shally. Multivalent designed proteins neutralize SARS-CoV-2 variants of concern and confer protection against infection in mice. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 646, 25 maio 2022.
- KADONOSONO, Tetsuya; YIMCHUEN, Wanaporn; OTA, Yumi; SEE, Kyra; FURUTA,

- Tadaomi; SHIOZAWA, Tadashi; KITAZAWA, Maika; GOTO, Yu; PATIL, Akash; KUCHIMARU, Takahiro. Design Strategy to Create Antibody Mimetics Harboring Immobilised Complementarity Determining Region Peptides for Practical Use. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 21 jan. 2020.
- KUHN, Bernd; GERBER, Paul; SCHULZ-GASCH, Tanja; STAHL, Martin. Validation and Use of the MM-PBSA Approach for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 4040-4048, 10 maio 2005.
- LADNER, Robert C . Mapping the Epitopes of Antibodies. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1-30, jan. 2007.
- LIAO, Xiaoli; RABIDEAU, Amy E.; PENTELUTE, Bradley L. Delivery of Antibody Mimics into Mammalian Cells via Anthrax Toxin Protective Antigen. **Chembiochem**, v. 15, n. 16, p. 2458-2466, 22 set. 2014.
- LU, Ruei-Min; HWANG, Yu-Chyi; LIU, I-Ju; LEE, Chi-Chiu; TSAI, Han-Zen; LI, Hsin-Jung; WU, Han-Chung. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 2 jan. 2020.
- MAIER, James A.; MARTINEZ, Carmenza; KASAVAJHALA, Koushik; WICKSTROM, Lauren; HAUSER, Kevin E.; SIMMERLING, Carlos. Ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99sb. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 8, p. 3696-3713, 23 jul. 2015.
- MICSONAI, András; WIEN, Frank; BULYÁKI, Éva; KUN, Judit; MOUSSONG, Éva; LEE, Young-Ho; GOTO, Yuji; RÉFRÉGIERS, Matthieu; KARDOS, József. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 315-322, 11 jun. 2018.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1300 p.
- NERATTINI, Francesca; TUBIANA, Luca; CARDELLI, Chiara; BIANCO, Valentino; DELLAGO, Christoph; COLUZZA, Ivan. Design of Protein–Protein Binding Sites Suggests a Rationale for Naturally Occurring Contact Areas. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 2, p. 1383-1392, 11 dez. 2018.
- OLUKITIBI, Titus A.; AO, Zhujun; WARNER, Bryce; UNAT, Rodrigo; KOBASA, Darwyn; YAO, Xiaojian. Significance of Conserved Regions in Coronavirus Spike Protein for Developing a Novel Vaccine against SARS-CoV-2 Infection. **Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 545, 24 fev. 2023.
- PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; COUCH, Gregory S.; GREENBLATT, Daniel M.; MENG, Elaine C.; FERRIN, Thomas E . UCSF

- Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, jul. 2004.
- PIERCE, Brian G.; BOUCHER, Elisabeth N.; PIEPENBRINK, Kurt H.; EJEMEL, Monir; RAPP, Chelsea A.; THOMAS, William D.; SUNDBERG, Eric J.; WENG, Zhiping; WANG, Yang. Structure-Based Design of Hepatitis C Virus Vaccines That Elicit Neutralizing Antibody Responses to a Conserved Epitope. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, 15 out. 2017.
- RAMARAJ, Thiruvarangan; ANGEL, Thomas; DRATZ, Edward A.; JESAITIS, Algirdas J.; MUMEY, Brendan. Antigen–antibody interface properties: composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1824, n. 3, p. 520-532, mar. 2012.
- SCOTT, Andrew M.; WOLCHOK, Jedd D.; OLD, Lloyd J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278-287, 22 mar. 2012.
- SHEU, Sheh-Yi; YANG, Dah-Yen; SELZLE, H. L.; SCHLAG, E. W. Energetics of hydrogen bonds in peptides. **Proceedings of the National Academy Of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12683-12687, 14 out. 2003.
- SHUAIB, Wan Muhammad Azfar Wan; BADARUDDIN, Izzatul Aliaa; MANSOR, Munirah; SALLEH, Sharifah Azura; HASSAN, Mohd Rohaizat; LINDONG, Steward; SAMAD, Shahril Nizam; OTHMAN, Hanita. SARS-CoV-2 S-RBD IgG Neutralizing antibodies among different categories of health care workers post third dose BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. **Human Vaccines Immunotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 1, 13 out. 2023.
- SIMEON, Rudo; CHEN, Zhilei. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics. **Protein Cell**, v. 9, n. 1, p. 3-14, 7 mar. 2017.
- SITTHIYOTHA, Thassanai; CHUNSRIVIROT, Surasak. Computational design of SARS-CoV-2 peptide binders with better predicted binding affinities than human ACE2 receptor. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2 ago. 2021.
- SPIEGEL, Jacob O.; DURRANT, Jacob D. AutoGrow4: an open-source genetic algorithm for de novo drug design and lead optimization. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 1, 17 abr. 2020.
- SU, Chinh Tran-To; NGUYEN, Thuy-Diem; ZHENG, Jie; KWOH, Chee-Keong. IFACEwat: the interfacial water-implemented re-ranking algorithm to improve the discrimination of near native structures for protein rigid docking. **Bmc Bioinformatics**, v. 15, n. 16, dez. 2014.
- VALIENTE, Pedro A.; WEN, Han; NIM, Satra; LEE, Jinah; KIM, Hyeon Ju; KIM,

- Jinhee; PEREZ-RIBA, Albert; PAUDEL, Yagya Prasad; HWANG, Insu; KIM, Kyun-Do. Computational Design of Potent D-Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 20, p. 14955-14967, 8 out. 2021.
- VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 1481 p.
- WANG, Ercheng; SUN, Huiyong; WANG, Junmei; WANG, Zhe; LIU, Hui; ZHANG, John Z. H.; HOU, Tingjun. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 16, p. 9478-9508, 24 jun. 2019.
- WATERHOUSE, Andrew; BERTONI, Martino; BIENERT, Stefan; STUDER, Gabriel; TAURIELLO, Gerardo; GUMIENNY, Rafal; HEER, Florian T; DEBEER, Tjaart A P; REMPFER, Christine; BORDOLI, Lorenza. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 296-303, 21 maio 2018.
- WHITTEN, Kenneth W.; DAVIS, Raymond E.; PECK, M. Larry; STANLEY, G. G. **Chemistry**. 10. ed. Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning, 2014. 1184 p.
- WIESMANN, Christian; FUH, Germaine; CHRISTINGER, Hans W.; EIGENBROT, Charles; WELLS, James A.; VOS, Abraham M. de. Crystal Structure at 1.7 Å Resolution of VEGF in Complex with Domain 2 of the Flt-1 Receptor. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 695-704, nov. 1997.
- WOODY, Robert W. Circular dichroism. **Methods in Enzymology**. v. 246, p. 34-71, 1995.
- WU, Yifei; LOU, Lei; XIE, Zhong-Ru. A Pilot Study of All-Computational Drug Design Protocol—From Structure Prediction to Interaction Analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 12 fev. 2020.
- YAN, Yumeng; TAO, Huanyu; HE, Jiahua; HUANG, Sheng-You. The HDock server for integrated protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 15, n. 5, p. 1829-1852, 8 abr. 2020.
- ZAHND, Christian; SPINELLI, Silvia; LUGINBÜHL, Béatrice; AMSTUTZ, Patrick; CAMBILLAU, Christian; PLÜCKTHUN, Andreas. Directed in Vitro Evolution and Crystallographic Analysis of a Peptide-binding Single Chain Antibody Fragment (scFv) with Low Picomolar Affinity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18870-18877, abr. 2004.