



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

**SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM CO-SOLVENTE PARA
BUSCA DE NOVOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO NA PROTEÍNA PD-L1**

FORTALEZA

2019

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM CO-SOLVENTE PARA BUSCA
DE NOVOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO NA PROTEÍNA PD-L1

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia, pertencente ao Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Computacional.

Orientador pedagógico: Prof. Dr. José Helio Costa.

Orientador técnico-científico: Dr. João Hermínio Martins da Silva.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C87s Costa, Andrielly Henriques dos Santos.
Simulação de dinâmica molecular com co-solvente para busca de novos sítios de interação na proteína PD-L1 / Andrielly Henriques dos Santos Costa. – 2019.
46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. José Helio Costa.

1. PD-L1. 2. Co-solvente. 3. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 570

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM CO-SOLVENTE PARA BUSCA
DE NOVOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO NA PROTEÍNA PD-L1

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia computacional.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Helio Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. João Hermínio Martins da Silva
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

Dr. Geraldo Rodrigues Sartori
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido o alívio em dias difíceis e ter me sustentado até aqui. Por ter me guiado durante a escalada da graduação e ter me permitido ver o pôr-do-sol no fim de tudo.

Aos meus pais, Adriana e Iran pelo carinho, educação, amor e compreensão investidos em mim. Por me inspirar a ser uma pessoa melhor e por todos os ensinamentos que levarei para a vida.

Aos meus irmãos, Igor, Iago e ao meu namorado Clesio por contribuírem com discussões que nem mesmo imaginavam estar acrescentando na minha vida acadêmica, por me instigar a olhar além do meu mundo limitado e por serem válvula de escape desse mundo insano.

Ao meu orientador pedagógico José Helio Costa pela orientação, pelos conselhos e alta disponibilidade em ajudar.

Ao meu orientador técnico-científico João Hermínio Martins da Silva, pela orientação, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em um ambiente tão enriquecedor.

Aos meus companheiros de laboratório, Aline, Beatriz, Disraeli, Jean, Luca e, em especial, Geraldo, por respirarem ciência e por aguçar meu conhecimento. Por terem sido mais do que colegas e me ajudarem a trilhar essa jornada com momentos de descontração, sorrisos sinceros e apoio emocional.

Aos meus amigos de graduação, Guilherme, Igor, Luzia, Vicente, Paulo Eduardo, entre outros, que em vários momentos da minha vida foram luz e conforto. Agradeço pelas inúmeras discussões enriquecedoras sobre o curso e mais um milhão de coisas além disso. Pelo carinho, companheirismo, choros e alegrias juntos, em várias tardes nas lanchonetes da Federal.

Aos demais amigos que fiz ao longo da vida, Elaine, Alessandra, Daniel, Camila, Vinicius e ao demais, pelo amor dado, pelos risos sinceros, pela enorme paciência, por terem sido sempre presentes. Vocês foram porto seguro em mais momentos do que posso recordar. Obrigada por terem dado cor à minha vida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de iniciação científica. Aos demais órgãos de fomento pelo apoio concedido ao trabalho.

“O mistério cria encanto e encanto é a base do nosso desejo de entender.”

Neil Armstrong

RESUMO

O receptor de checkpoint imunológico PD-1 e seu ligante PD-L1 têm se mostrado eficazes como alvos para desenvolvimento de imunoterápicos contra o câncer. O conhecimento sobre o modo de interação entre os sistemas vem dando suporte para o desenvolvimento de novas drogas efetivas no controle de células tumorais. Na literatura, já estão descritos o modo de ligação da PD-L1 com PD-1, bem como com anticorpos e pequenas moléculas. Entretanto, é possível que haja sítios de interação escondidos, cuja exposição ocorre somente mediante presença de ligante (sítios crípticos). Pesquisas nessa área são aplicadas para modular a interação proteína-proteína, por meio de *virtual screening*, na modulação alostérica, entre outros, para o desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, abordagens *in silico* têm sido exploradas na busca por novos sítios de interação e, em especial, simulações de sistemas por dinâmica molecular são utilizadas para compreender a flutuação conformacional das proteínas frente a agentes externos, sendo suporte para pesquisas na área de biologia estrutural. O presente trabalho teve como objetivo a análise de parâmetros de flexibilidade da proteína PD-L1, assim como a definição de um sistema controlado para triagem de sítios crípticos na proteína PD-L1 por meio de simulação de dinâmica molecular com co-solventes. Nossos resultados mostram que o comportamento da alça C[”]D é crucial para alteração na flexibilidade da proteína, bem como são determinantes na transição entre diferentes estados conformacionais. Uma análise detalhada dos ângulos entre os resíduos da proteína, demonstraram especificamente que os diedros 57ψ e 58ψ eram responsáveis pela diferença entre condições, bem como o valor dos ângulos exigidos para que ocorresse a transição de estados conformacionais. Para investigar sítios crípticos na PD-L1, co-solventes com caráter aromático se mostraram mais eficientes em interagir com a proteína. Dentre eles, benzeno obteve sucesso em achar sítio inédito na PD-L1, que diverge das principais regiões de interação entre PD-L1 e inibidores descritos na literatura. Assim, o trabalho sugere novas regiões de interação, com possível uso para regulação alostérica, que podem ser usadas como alvos para desenho de novas moléculas bioativas.

Palavras-chave: PD-L1. Co-solvente. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

The immune checkpoint receptor PD-1 and its ligand PD-L1 have been shown to be effective targets to development of monoclonal antibody. The knowledge about the interaction between the systems supports the development of new effective drugs to control tumor cells. In the literature, the PD-L1 mode of binding with PD-1, as well as with antibodies and small molecules are already described. However, it is possible that there are hidden interaction sites, whose exposure occurs only through the presence of ligand (cryptic sites). Research in this area is applied to modulate protein-protein interaction through virtual screening, allosteric modulation, for drug development. In this context, in silico approaches have been explored in search of new interaction sites and, in particular, molecular dynamics simulations are used to understand protein conformational fluctuation in presence of external agents, supporting research in the field of structural biology. The aim of the present study was to analyse PD-L1 protein flexibility parameters, also the definition of a controlled system for screening of PD-L1 protein cryptic sites by simulating molecular dynamics with co-solvents. Our results show that C^αD loop behavior is crucial for changing protein flexibility, as well as determining the transition between different conformational states. A detailed analysis of main chain dihedrals of these loop residues specifically demonstrated that the dihedrals 57 ψ and 58 ψ were responsible for the difference between coefficient values, additionally the value of the angles required for the conformational state transition to occur. To investigate cryptic sites in PD-L1, aromatic co-solvents were more efficient in interacting with the protein. Among them, benzene successfully found an unprecedented site in PD-L1, which differs from the main interaction regions between PD-L1 and inhibitors described in the literature. Thus, we suggests new regions of interaction, with possible use for allosteric regulation, which can be used as targets for the design of new bioactive molecules.

Keywords: PD-L1. Co-solvents. Molecular dynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem e regulação da imunidade antitumoral.....	2
Figura 2- Sinalização intracelular da PD-1.....	4
Figura 3 - Estrutura da PD-L1. Em ciano, identificadas as estruturas em fita, em azul estão carboxi-terminal e n-terminal, em rosa, estruturas em alça.	5
Figura 4 - Análise de componente principal dos cristais de PD-L1 disponíveis no PDB. O conjunto de pontos em gradiente representa uma simulação de dinâmica realizada com uma das estruturas em vermelho.....	9
Figura 5– Posicionamento e amplitude do movimento das alças BC e C'D (em rosa) na proteína PD-L1 durante a simulação de dinâmica molecular.....	14
Figura 6– Gráfico da Análise de Componente Principal. Em verde os frames da cMd controle. A estrutura do cristal 3NF3 está em vermelho. Em laranja e roxo, as cMD na condição 1 e a condição 2, respectivamente. O cristal 5JDS está em marrom e as demais estruturas do PDB estão em preto.	15
Figura 7– Desvio Quadrático Médio. Condição 1. (a) e (b) condição 2, replicatas 1, 2, 3 e 4 representadas respectivamente nas cores preto, vermelho, azul e verde.	16
Figura 8– Gráfico da Flutuação Quadrática Média. Condição 1 (a) e condição 2. Replicatas 1, 2, 3, e 4 em preto, vermelho, azul e verde, respectivamente. As estruturas em alça estão destacadas em laranja.....	17
Figura 9– Distância (Å) entre os resíduos Lys27 e Ser 74 da PD-L1 em função do tempo de simulação para a A) condição 1 e B) condição 2. Barras verticais indicam separação entre replicatas.....	18
Figura 10– Gráfico da Análise de Componente Principal da PD-L1 completa (a) e da alça C'D (b). Em verde os frames da cMd, a estrutura do cristal 3NF3 está em rosa. Em laranja e roxo, as cMD na condição 1 e a condição 2, respectivamente. A aMD disposta em vermelho. As demais estruturas do PDB estão em preto.....	19
Figura 11– A) Desvio e B) Flutuação Quadrática Média da aMD.....	20
Figura 12– Distribuição de diedros específicos da PD-L1. Dados da simulação controle, cMD e aMD em azul, laranja preenchido e vermelho, respectivamente.....	22
Figura 13. Resíduos acessados de acordo com características químicas (%).....	23
Figura 14– Somatório de contatos entre sonda/ resíduo.....	24
Figura 15– Volume das cavidades selecionadas durante a simulação de 50ns. Em violeta acetato, água em azul, benzeno em preto, fenol em laranja, imidazol em verde e n-metil-acetamida em vermelho. Cada gráfico corresponde a uma cavidade sugerida pelo fpocket.	27
Figura 16– Sítio críptico na PD-L1. A conformação com cavidade aberta se encontra em rosa, com benzeno em laranja posicionado no sítio. A representação da superfície da estrutura inicial da simulação está disposta em grade na cor azul.....	28
Figura 17. Alinhamento das estruturas cristalográficas de PD-L1 disponíveis no PDB em relação à presença de água (representação em forma de esfera vermelha).	29
Figura 18. Regiões de alta probabilidade de interação fornecidas pelo Fpocket.	30
Figura 19. Regiões de alta probabilidade de interação fornecidas pelo DogSite	30
Figura 20. Disposição tridimensional da PD-L1 (em rosa) ligada com a proteína PD-1 (em ciano). Em azul está disposta a região correspondente a sítio críptico.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de hotspots	25
Tabela 2. Somatório de contatos por hotspots agrupados – Contatos comuns. O aumento da intensidade da cor vermelha reflete no aumento do número de frames em que a sonda teve contato com o resíduo por replicata (R).....	25
Tabela 3. Somatório de contatos por hotspots agrupados – Contatos raros.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer.....	1
1.2	Imunoterapia	1
1.2.1	<i>Checkpoint imunológico e interação PD-1/PD-L1</i>	3
1.2.2	<i>PD-L1 na imunoterapia</i>	5
1.3	Sítios Crípticos.....	7
1.4	Simulação de dinâmica molecular	7
1.5	Análise dos cristais de PD-L1	8
2	OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.1	Objetivos específicos.....	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1	Montagem do sistema.....	11
3.1.1	<i>Preparo dos arquivos.....</i>	11
3.1.2	<i>Preparo dos ligantes</i>	11
3.1.3	<i>Preparo do complexo.....</i>	12
3.2	Simulação de dinâmica molecular	12
3.3	Análise de trajetória.....	13
3.4	Detecção e análise de cavidades	13
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1	Análise estrutural da PD-L1.....	14
4.2	Co-solvente na busca de cavidades na PD-L1.....	23
5	CONCLUSÃO	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo usado para caracterizar uma série de desordens sistêmicas da maquinaria de divisão celular, replicação e reparo do DNA (NALL, 2018). É atualmente um dos maiores desafios das ciências médicas, acumulando estatísticas preocupantes referentes à saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 9,6 milhões de pessoas tenham morrido devido ao câncer em 2018. Ademais, em relação ao custo econômico anual com o tratamento da doença, foi estimado um gasto de 1,16 trilhões de dólares em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para 2019 a ocorrência de 640 mil novos casos da doença (“Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil”, 2017).

A diversidade de tipos de câncer salienta a dificuldade de tratar a doença, principalmente em consequência de suas características intrínsecas relacionadas, como instabilidade genômica, desbalanço energético, interação com o sistema imune, bem como capacidade de provocar inflamação, evitar a apoptose pela via imune, dentre outros (SHARMA; ALLISON, 2015). Esses atributos conferem às células tumorais capacidade de se espalhar, atingir tecidos e causar desordem no microambiente. Em geral, o tratamento da maioria dos tipos de câncer se dá por excisão cirúrgica, acompanhado de radiação ou quimioterapia como forma de eliminar células metastáticas residuais. Esses métodos, apesar de terem sido estabelecidos por anos nas ciências médicas, são procedimentos extremamente desagradáveis para o paciente, além de possuírem uma baixa eficácia no caso de tumores com alto índice de mutação e adaptação (OISETH; AZIZ, 2017). Conforme ocorre a evolução de técnicas laboratoriais, também ocorre o aperfeiçoamento dos métodos de tratamento de diversas doenças. No caso do câncer, a imunoterapia surgiu como uma forma de driblar as desvantagens dos métodos convencionais de tratamento, como queda de cabelo, náuseas ou vômito, indisposição.

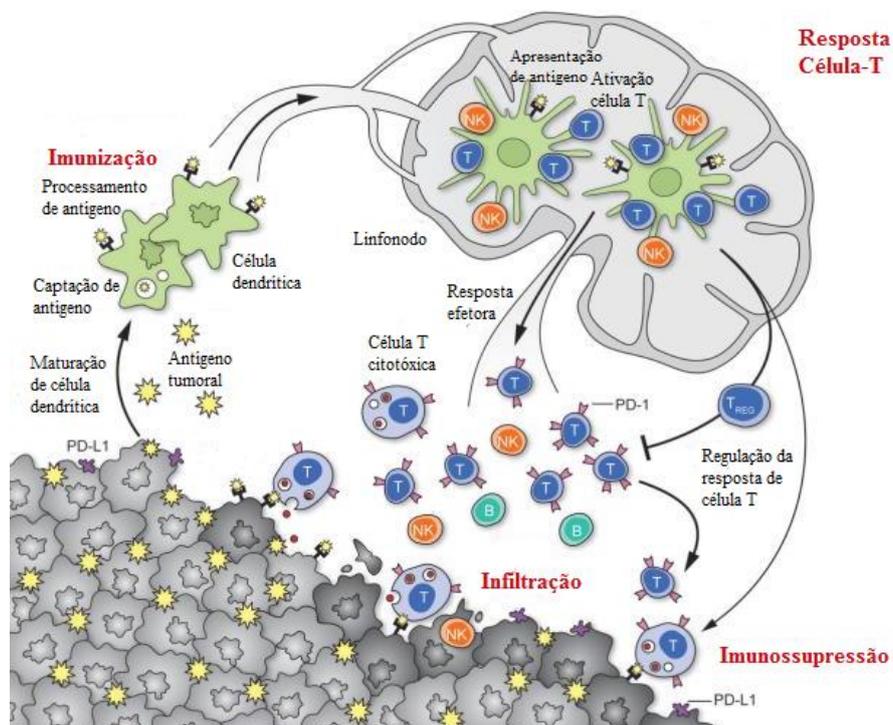
1.2 Imunoterapia

De fato, células cancerígenas possuem uma comunicação íntima com o sistema imune por expressarem uma série de biomoléculas responsáveis pela interação célula-célula, como Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), Prostaglandina E2, Ligantes CTLA-4, Ligante-1 do Receptor de Morte Programada (PD-L1), entre outros (OISETH; AZIZ, 2017),(SCHUSTER; NECHANSKY; KIRCHEIS, 2006). A produção

dessas proteínas por células tumorais induz diversas vias inativadoras em componentes do sistema imunológico, e em consequência, suprime vias de checagem de células, induz a produção de compostos secundários favoráveis ao microambiente tumoral assim como inibe a resposta de morte celular programada que deveria ser gerada contra o tumor (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

Com base na sequência de eventos entre a apresentação de antígeno e ativação de resposta antitumoral, é possível indicar que há três vias de possível intervenção terapêutica baseadas na imunoterapia: durante a apresentação de antígenos realizado pelas células dendríticas, ao longo do estímulo da resposta protetora das células T e na imunossupressão causada pelo tumor.

Figura 1 - Origem e regulação da imunidade antitumoral.



Fonte: Adaptado de Nature. 2011 Dez 21; (2011, p. 480).

O início da resposta imune se dá na captura e processamento de fragmentos celulares pelas células dendríticas. Os antígenos associados ao tumor são englobados para apresentação via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe II e I (neste último sob condição de apresentação cruzada) e serão reconhecidos pelos receptores de célula T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

Caso haja estímulo de maturação imunogênico, as células dendríticas irão desencadear resposta de ataque ao tumor em células T efetoras presentes no linfonodo. Caso não haja nenhum estímulo induzido, células dendríticas irão promover a tolerância,

levando à depleção de células T, anergia de linfócitos ou produção de células T reguladoras (células Treg.) (INABA et al., 2000) (Figura 1).

No linfonodo, a resposta induzida durante a apresentação do antígeno depende não somente do tipo de estímulo provocado pelas células dendríticas, mas também da interação entre moléculas co-estimuladoras das células T com receptores de membrana das células dendríticas. De modo que, para que haja a ativação do linfócito, são necessários estímulos secundários, como exemplo, a interação da OX40 com seu ligante OX40L (WEBB; HIRSCHFIELD; LANE, 2016) que promove respostas protetoras nos linfócitos, mas também interações entre CTLA4 e CD80/86, que induzem supressão da atividade de células T e possivelmente promovem a formação de T reg (VANDENBORRE et al., 1999), (MESQUITA JÚNIOR; SILVA, 2010), (Figura 1. Resposta da célula T).

Linfócitos selecionados positivamente sairão do linfonodo maduros e entrarão em contato com as células tumorais, onde devem reconhecer epítomos do tumor e estimular uma série de mecanismos de inativação celular e apoptose (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011). Entretanto, como mencionado, células cancerígenas possuem um mecanismo de comunicação com o sistema imune capaz de inativar linfócitos. Isso inclui expressão de PD-L1 na superfície da membrana, bem como liberação de prostaglandina E2 (PGE2) (CHOUAIB et al., 1985), indolamina 2,3,dioxigenase (IDO) (KOBBLISH et al., 2010) e outras moléculas já conhecidas como supressores de células T (OISETH; AZIZ, 2017) (Figura 1. Imunossupressão).

Como estratégias de intervenção das vias citadas, são exemplos pesquisas com o cultivo e uso de linfócitos engenheirados (PORTER et al., 2011)(BRENTJENS et al., 2013), imunização por meio de vacinas anticâncer (HARZSTARK; SMALL, 2006; SCHWARTZENTRUBER et al., 2011) ou o bloqueio de moléculas das vias de checkpoint imunológico por meio do uso de anticorpos monoclonais (MICHOT et al., 2016),(KEIR et al., 2008), (GURAM et al., 2019).

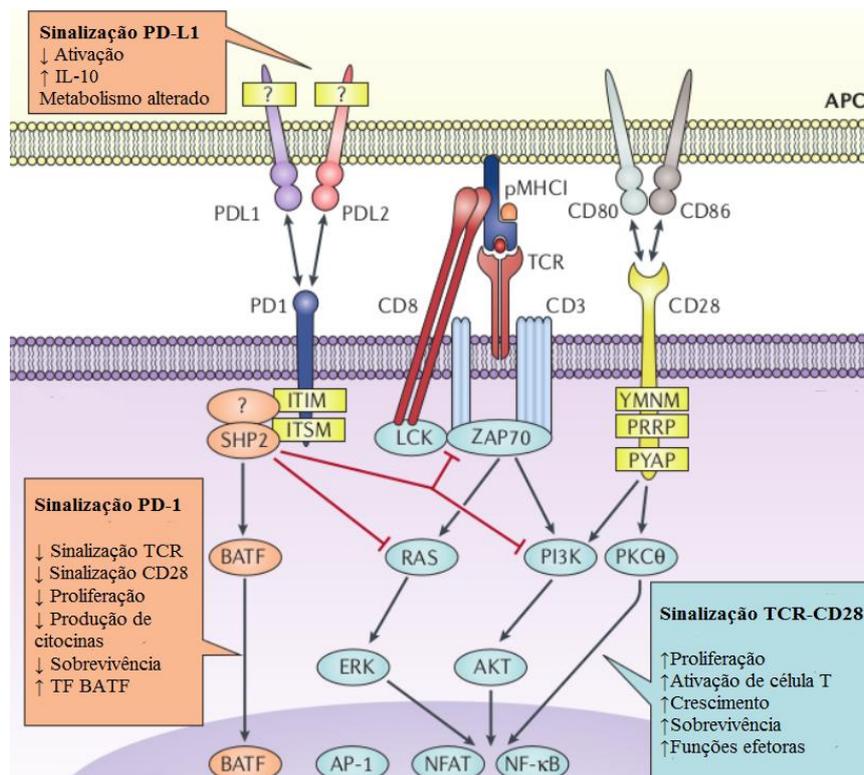
1.2.1 Checkpoint imunológico e interação PD-1/PD-L1

A resposta imune é regida por um sistema complexo e preciso que contrabalanceia a imunidade e a tolerância. O sistema se baseia em pontos de checagem que controlam o funcionamento correto das células do sistema imune, podendo promover ativação de células T virgens, bem como induzir respostas efectoras ou memória em células T. Respostas inibitórias também podem ser deflagradas para manutenção da homeostase do meio e impedir reações autoimunes ou inflamação exacerbada. Esses

pontos de checagem também são chamados de vias de *checkpoint* imunológico (SHARPE, 2017). Essas vias podem ser usadas por tumores para deflagrar respostas de imunossupressão, sendo uma das principais formas de escape do sistema imune.

Uma das principais vias de *checkpoint* imunológico estudadas atualmente é a interação entre a proteína de morte celular programada 1 (PD-1, do inglês *Programmed cell death protein 1*, também chamada CD279) e seus ligantes PD-L1 (CD274 ou B7H1) e PD-L2 (CD273 ou B7DC) (GANDINI; MASSI; MANDALÀ, 2016).

Figura 2- Sinalização intracelular da PD-1.



Fonte: Adaptado de Nature Reviews *Immunology*. 2018 Jan 18; (2018, p. 153).

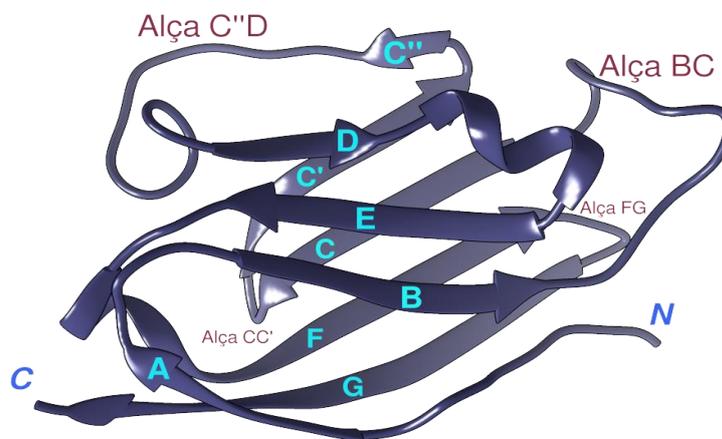
A proteína PD-1 é expressa na membrana celular durante a ativação de células T e possui em seu domínio intracelular dois motivos baseados em tirosina, o motivo imunoreceptor de inibição baseado em tirosina (ITIM) e o motivo imunoreceptor comutador (switch) baseado em tirosina (ITSM) (DAËRON et al., 2008). Ao se ligar com um de seus ligantes, PD-1 tem seus domínios fosforilados, o que recruta fosfatases, como a SHP2 (Src homology 2 domain–containing tyrosine phosphatase 2), dando início a uma cascata de sinalização inibitória, conforme pode-se ver na Figura 2. As fosfatases desfosforilam cinases de vias envolvidas diretamente na sinalização de TCRs, como fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K), RAS, cinase regulada pela sinalização extracelular (ERK), fosfolipase C γ (PLC γ), entre outras (PHARES et al., 2009; YAO et al., 2009).

Sob o contexto da normalidade do ambiente celular, a interação PD-1/ligante assume uma função importante na manutenção da homeostase. Sinais inibitórios equilibram o sistema imune e limitam respostas imunopatológicas, impedindo que reações exacerbadas ocorram. Alterações na via PD-1 impactam negativamente na fisiologia do tecido, como desenvolvimento de reações autoimunes.

1.2.2 PD-L1 na imunoterapia

Quando se trata do contexto do microambiente tumoral, a via PD-1 toma uma perspectiva diferente. Células tumorais são capazes de superexpressar a proteína PD-L1, levando à inativação de linfócitos e consequente imunossupressão (ESCORS et al., 2018; MICHOT et al., 2016). PD-1 tem uma rede complexa de interação em linfócitos, isso salienta a sua importância biológica, ao passo que as funções intracelulares do seu ligante PD-L1 não são bem estabelecidas.

Figura 3 - Estrutura da PD-L1. Em ciano, identificadas as estruturas em fita, em azul estão carboxi-terminal e n-terminal, em rosa, estruturas em alça.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O fato de PD-L1 ser expressa na membrana de células tumorais e devido à importância biológica da PD-1 na regulação da homeostase do organismo, mostra que tomar como alvo a PD-L1 é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais.

A PD-L1 é um receptor transmembrana tipo I com uma imunoglobulina constante (IgC) e uma IgV na porção extracelular (Figura 3). A superfície GFCC' da porção IgV na PD-L1 é a interface de interação com a proteína PD-1 (fitas GFCC', alça CC', alça CC'' e alça FG). Seu domínio intracelular é curto e contém três sequências de aminoácidos que são conservados entre os receptores PD-L1 de mamíferos, os motivos

DTSSK, QFEET e RMLDVEKC (AHMED; BARAKAT, 2017a; ESCORS et al., 2018). A expressão da PD-L1 pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias e sua função intracelular não está bem estabelecida (SHARPE; PAUKEN, 2018)(VANDENBORRE et al., 1999).

Tabela 1. Anticorpos aprovados pelo FDA

Nome	Anticorpo	Ano de aprovação	Tipos de tumor	Citação
Atezolizumab	anti-PD-L1	2016	Carcinoma urotelial	(RITTMAYER et al., 2017)
		2016	Câncer pulmonar	
Avelumab	anti-PD-L1	2016	Tumor de Merkel	(KAUFMAN et al., 2016)
		2016	Carcinoma urotelial	
Durvalumab	anti-PD-L1	2017	Carcinoma urotelial	(ANTONIA et al., 2017)
		2018	Câncer pulmonar	
Cemiplimab	anti-PD1	2018	Carcinoma cutâneo	(MIGDEN et al., 2018)
Nivolumab	anti-PD1	2014	Melanoma	(LESOKHIN et al., 2016)
		2015	Câncer pulmonar	
		2016	Linfoma de Hodgkin	
		2016	Câncer de cabeça e pescoço	
		2017	Carcinoma urotelial	
		2017	Carcinoma hepatocelular	
		2017	Carcinoma hepatocelular	
Pembrolizumab	anti-PD1	2014	Melanoma	(BELLMUNT et al., 2017)
		2015	Câncer pulmonar	
		2016	Câncer de cabeça e pescoço	
		2017	Linfoma de Hodgkin	
		2017	Carcinoma urotelial	
		2017	Carcinoma gastrico	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Atualmente, existem seis imunoterápicos baseados na interação PD-1/PD-L1 aprovados pela agência *Food and Drug Administration* (FDA), conforme mostrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Estes são usados contra vários tipos de câncer, dentre eles o melanoma, câncer de bexiga, câncer de próstata, linfoma, dentre outros (SHARPE; PAUKEN, 2018) e todos possuem a estrutura cristalizada no *Protein Data Bank* (PDB).

Embora a imunoterapia venha atingindo bons resultados no tratamento de diversos tipos de câncer, muita informação sobre a interação proteína-proteína no

microambiente tumoral ainda permanece desconhecida. O entendimento sobre a comunicação intracelular é a chave no desenvolvimento de novas drogas mais eficientes, assim como a descoberta de novos sítios de interação em uma proteína aumenta a possibilidade de regiões alvo para o planejamento racional de fármacos.

Tem-se despendido muito esforço na busca de novos sítios de interação em proteínas de vias chave do processo, de forma que não basta apenas entender a dinâmica convencional do sistema, mas também é preciso buscar por regiões de interação na proteína que aparecem raras vezes, que são de difícil detecção por métodos *in vitro*.

1.3 Sítios Crípticos

Sítios crípticos são pequenas regiões transientes de interação, formadas mediante a presença de um ligante em holoproteínas, mas que não são passíveis de detecção em apoproteínas (VAJDA et al., 2018a). Geralmente um sítio críptico é encontrado distante da principal região de interação da proteína, além de que são amplamente usados em processos de reconhecimento entre proteínas, assim como na modulação alostérica. A importância desses sítios é bastante discutida em proteínas biologicamente relevantes, mas que não podem ser alvos de fármacos por uma característica intrínseca, como exemplo, não possuir cavidades capazes de comportar de modo estável um ligante.

O maior desafio em estudos com sítios crípticos se dá pela limitação das técnicas de detecção, o que reflete na dificuldade de encontrar e descrever essas regiões. A maioria dos sítios descritos foram achados ao acaso, quando um solvente induzia a abertura da cavidade, que seria posteriormente observada na estrutura cristalizada, como exemplo. Neste caso, técnicas *in silico* têm ganhado espaço na detecção de sítios crípticos, pela acurácia e proximidade ao real. (VAJDA et al., 2018a)

1.4 Simulação de dinâmica molecular

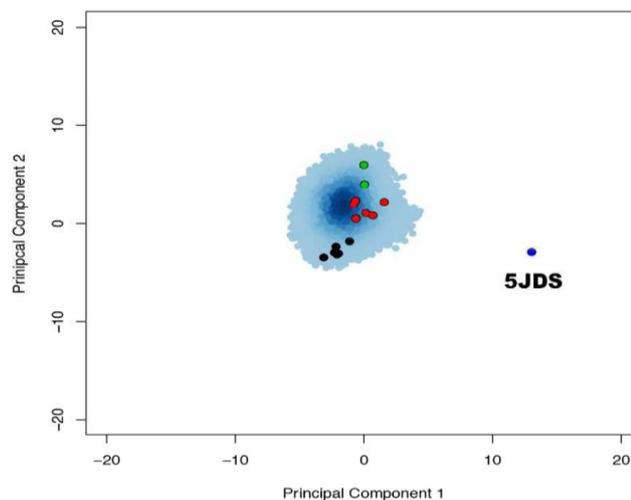
A pesquisa com biomoléculas possui algumas barreiras que limitam a produção de dados, principalmente quando se menciona todo o processo de produção heteróloga, testes toxicológicos e viabilidade de produção em larga escala. Técnicas *in silico* vêm surgindo como coadjuvante na pesquisa científica juntamente com técnicas *in vivo/in vitro*. Além de serem uma opção de barateamento das pesquisas científicas, métodos computacionais permitem a previsão de comportamentos de sistemas a nível atômico que não eram observados com outros recursos, de modo que tem servido para integrar dados e gerar novas informações na oncologia (SHARPE, 2017).

Simulações de Dinâmica Molecular (DM), em especial, permitem entender a flutuação estrutural de biomoléculas em um período, o que fornece uma avaliação da mobilidade ou flexibilidade de várias regiões da molécula. DM é um método preditivo que simula interações entre átomos de uma estrutura complexa aplicando modelos matemáticos de campo de força, ligações entre átomos e outros descritores que governam as interações interatômicas. Essas simulações fornecem descrição de uma gama de processos biológicos, como mudança conformacional mediante inserção de ligante, interação proteína-proteína, a resposta estrutural da macromolécula após uma mudança controlada no sistema (como fosforilação, mutação, protonação, enovelamento proteico, entre outros). Uma proteína está em constante movimento no meio celular, a compreensão da flutuação das estruturas conformacionais em uma simulação é uma informação crucial para determinar sua funcionalidade e comportamento mediante ligante (MOMTAZ; POSTOW, 2014).

1.5 Análise dos cristais de PD-L1

Para simulações de DM, PD-L1 possui porções extra e intracelulares já caracterizadas e com um número suficiente de estruturas cristalográficas disponíveis no *Protein Data Bank* (BERMAN et al., 2000). É possível encontrar o cristal da proteína na forma livre (apo), assim como também da estrutura complexada com peptídeos, proteínas ou pequenas moléculas. Uma análise da plasticidade estrutural feita a partir desses cristais por Ahmed et al (AHMED; BARAKAT, 2017a) demonstra a variação entre cada conformação, onde cada cristal é organizado de acordo com a disposição espacial assumida pela estrutura durante o processo de cristalização. Conforme observado na Figura 4, a estrutura com código 5JDS, co-cristalizada com nanocorpo KN035, é agrupada separadamente das demais estruturas, indicando uma nova configuração possível para PD-L1.

Figura 4 - Análise de componente principal dos cristais de PD-L1 disponíveis no PDB. O conjunto de pontos em gradiente representa uma simulação de dinâmica realizada com uma das estruturas em vermelho.



Fonte: *Biochemistry*. 2017 Set 12; (2017, p. 5428).

No trabalho, a partir de uma estrutura do cluster mais comum, os autores realizaram uma simulação para tentar varrer o espaço conformacional da 5JDS, mas não foi possível alcançar o mesmo, deixando em aberto a questão do porquê a 5JDS é diferente das demais. Uma conformação rara assumida por uma proteína é um alvo promissor para estudos de modulação conformacional de proteínas (VAJDA et al., 2018b), (AHMED; BARAKAT, 2017b).

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do trabalho foi analisar parâmetros de flexibilidade e estabilidade da estrutura cristalina da PD-L1 ,5JDS, assim como definir um sistema controlado para a proteína e utilizar a estrutura para encontrar sítios críticos por meio de simulação de dinâmica molecular com co-solvente, a fim de criar suporte para futuros estudos de planejamento racional de fármacos.

2.1 Objetivos específicos

- a) Descrever a flexibilidade e espaço conformacional da proteína PD-L1
- b) Analisar o comportamento da estrutura cristalográfica 5JDS em comparação com outra simulação controle;
- c) Compreender as alterações conformacionais a nível de coordenadas, trajetória e influência dos resíduos na cadeia principal da proteína PD-L1;
- d) Induzir abertura de sítios críticos por meio do uso de co-solventes;
- e) Identificar novos sítios de interação na PD-L1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Montagem do sistema

3.1.1 Preparo dos arquivos

A estrutura cristalográfica da PD-L1 humana co-cristalizada com o nanocorpo KN035 (código 5JDS) foi obtida no Protein Data Bank (PDB) (ZHANG et al., 2017) e usada como estrutura inicial para a DM. O servidor online PDB2PQR - PropKa (ROSTKOWSKI et al., 2011) foi usado para determinar o estado de protonação dos resíduos em pH fisiológico (7,4). A ferramenta LEaP do Amber 18 (CASE et al., 2005) foi usada para tratar o arquivo PDB, determinando o campo de força ff14SB (MAIER et al., 2015) e uma caixa cúbica de 15Å com água do tipo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). Não foi necessário realizar nenhuma correção de mutação na estrutura tridimensional obtida. Para tratar o arquivo com informações de topologia da proteína (arquivo PDB), foram retirados os átomos do nanocorpo KN035, as moléculas de água e íons presentes. Apenas a porção IgV da proteína foi utilizada na simulação.

3.1.2 Preparo dos ligantes

Simulações com co-solventes têm sido usadas como forma de observar modificação estrutural mediante ligante. O uso de co-solvente é necessário em estudos de sítios críticos, visto que o sítio só mantém abertura estável mediante o ligante (VAJDA et al., 2018b). No trabalho foram escolhidos 5 co-solventes: acetato, benzeno, fenol, imidazol e n-metil-acetamida, a escolha foi baseada na semelhança das sondas orgânicas com a cadeia lateral dos aminoácidos (ou cadeia principal da proteína, no caso do n-metil-acetamida).

A estrutura tridimensional de cada uma das sondas foi obtida no banco de moléculas PubChem (KIM et al., 2019; WANG et al., 2009). Para a parametrização dos co-solventes no campo de força general amber forcefield2 - gaff2 (VASSETTI; PAGLIAI; PROCACCI, 2019), foi utilizado o método de derivação de cargas Restrained Electrostatic Potential (RESP) através do programa R. E. D. Server (VANQUELEF et al., 2011). Antechamber e tleap foram usados para gerar os arquivos contendo informações sobre os átomos, ligações e subestruturas (arquivo mol2), bem como dados de modificação de topologia, ângulo de diedro (arquivo frcmod), entre outros.

3.1.3 Preparo do complexo

A ferramenta Packmol foi usada para distribuição uniforme das sondas pela caixa de solvente. A proteína foi solvatada em uma caixa de 15 Å com água TIP3P e concentração salina semelhante ao fisiológico (0,16 M) e as sondas em concentração de 0,2 M, com pressão mantida a 0,997 atm. Os arquivos iniciais de trajetória e coordenada foram gerados com o LEaP (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013)

3.2 Simulação de dinâmica molecular

Durante a execução do trabalho, realizou-se duas dinâmicas convencionais (cMD) com diferentes frequências de choque das moléculas de solvente e posteriormente uma dinâmica acelerada (aMD) no programa Amber18 (CASE et al., 2005). Foi utilizado o barostato Monte Carlo, juntamente com o termostato de Langevin. Para explorar sítios críticos na proteína, assumiu-se a padronização de uma cMD com frequência de choque igual a 1. Em todas as simulações, os arquivos de topologia e coordenada foram submetidos aos seguintes passos de tratamento antes da dinâmica molecular: minimização energética, aquecimento do sistema, ajuste da densidade da caixa de água e equilíbrio do sistema.

A etapa de minimização de energia ocorreu primeiramente com restrição da PD-L1, para acomodação do sistema e posteriormente sem restrição, em um total de 20.000 passos. A simulação com sondas necessitou de três passos de restrição, a primeira restringindo a proteína e as sondas, a segunda apenas a proteína restringida e uma última minimização de todo o sistema solto. Todos os sistemas foram aquecidos gradualmente para 310K a volume constante (ensemble NPT), sujeitos a restrição com constante de força 10,0 kcal/mol/Å². Para essa etapa, foi definida uma rampa de aquecimento gradual durante 160 ps e manutenção da temperatura final por outros 40 ps.

A densidade do sistema foi estabilizada mediante definição de pressão da caixa de solvente constante e sob restrição na proteína com constante de força 10,0 kcal/mol/Å². A equilíbrio foi feita por 10ns, com barostato Monte Carlo com pressão constante a 1 atm, sem restrição.

Para o estudo estrutural foram assumidas duas condições diferentes de DM. A primeira condição (condição 1) manteve o choque de frequência das moléculas igual a um e a dinâmica foi realizada com quatro repetições, cada uma em um tempo total de 200ns. Posteriormente o fator de choque de termalização foi alterado para dois (condição 2) e feitas três replicatas com 100 ns. Para simulação com sondas, foram feitas 10 replicatas de 50ns. As simulações rodaram sob pressão constante de 1 atm.

A dinâmica acelerada foi executada com os mesmos parâmetros da dinâmica convencional, porém com adição de impulso e torção na simulação, assumindo adição de impulso de -79368.1318 kcal/mol em energia potencial e 1854.5 kcal/mol no termo torsional do potencial.

3.3 Análise de trajetória

O pacote Cpptraj embutido no ambiente AmberTools foi usado para processamento das coordenadas e trajetórias das amostras. Os gráficos do desvio quadrático médio (RMSD) e da flutuação quadrática média (RMSF) foram gerados após comparação entre as trajetórias obtidas na dinâmica e a referência da estrutura da 5JDS. Cpptraj também foi utilizado para calcular a distância, bem como análise do tempo de contato e número de interações entre sondas e resíduos.

A Análise de Componente Principal (PCA, do inglês, *principal component analyses*) foi gerada pelo programa pyPcazip (SHKURTI et al., 2016). O programa é utilizado para identificação coletiva da direção e amplitude dos movimentos das proteínas, descrevendo o mesmo em componentes principais. A visualização interativa da proteína e a análise da estrutura molecular foram realizadas pelo Chimera (PETTERSEN et al., 2004). Todos os gráficos foram gerados pelo Xmgrace. Os dados estruturais foram comparados com uma Dinâmica Molecular controle cedida por um colaborador do laboratório (dados não mostrados).

3.4 Detecção e análise de cavidades

Fpocket (LE GUILLOUX; SCHMIDTKE; TUFFERY, 2009) foi utilizado para detecção de cavidades na proteína. Os dados gerados no programa foram utilizados para comparar com os resultados obtidos com a simulação em co-solvente e água. Para análise de sítios transientes durante a simulação, foi utilizada a derivação do programa mdpocket, com parâmetros específicos para detecção de pequenas cavidades (-m 2.8 -M 5.5 -i 3 -n 2). O volume da cavidade foi dado usando um algoritmo Monte Carlo, baseado em mosaico de Voronoi e alfa esferas (KIM et al., 2008).

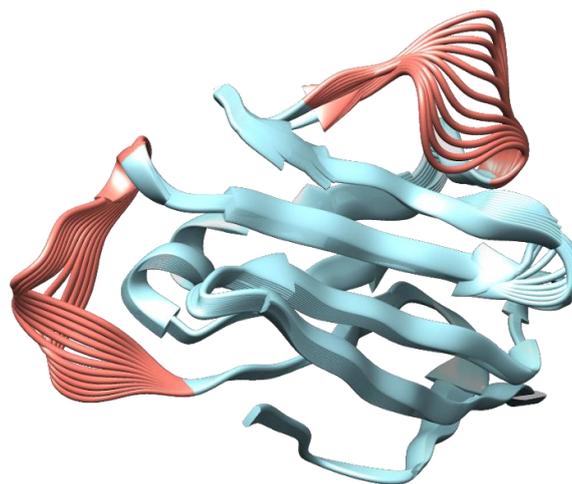
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise estrutural da PD-L1

Um cristal proteico é análogo a uma fotografia, ambos captam apenas um momento, não permitindo visualizar a dinâmica de um sistema. Desse modo, diversos fatores são capazes de interferir na identificação da proteína por cristalografia, como empacotamento cristalino, baixa resolução, entre outros. Foi feita uma análise visual para comparadas estruturas de PD-L1 co-cristalizadas com ligantes. Observou-se que a estrutura da porção IgV da PD-L1 não foi alterada por outro fator além da interação com o nanocorpo, sugerindo que a interação com este é responsável por sua diferença estrutural comparada com os outros cristais.

Posteriormente, nós realizamos uma dinâmica molecular a fim de verificar se durante a simulação a proteína tendia a assumir uma conformação próxima das demais estruturas do PDB. A caracterização do espaço conformacional dos frames foi realizada por meio de um gráfico de análise de componentes principais, PCA. A PCA foi gerada com base em dois movimentos principais, o deslocamento da alça BC e da alça C'D (Figura 5).

Figura 5– Posicionamento e amplitude do movimento das alças BC e C'D (em rosa) na proteína PD-L1 durante a simulação de dinâmica molecular.

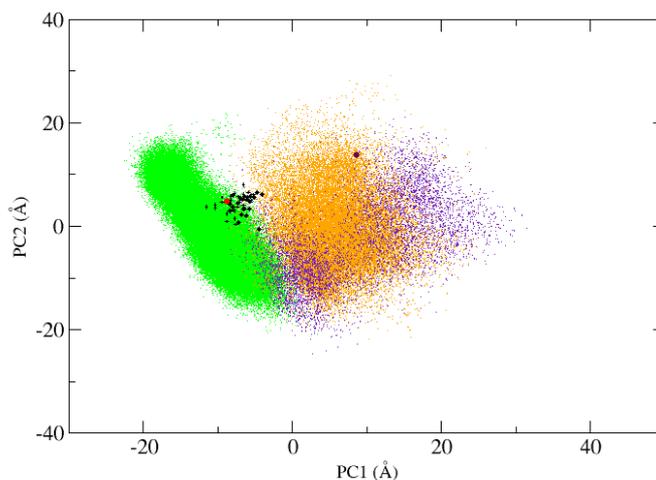


Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 6 contém os dados das dinâmicas da 5JDS nas condições um e dois, cuja diferença se dá pela frequência do choque das moléculas de solvente no termostato de Langevin. Condição 1 tem frequência de choques igual a 1 e condição 2 tem frequência igual a 2. Podemos notar que a simulação de dinâmica molecular da 3FN3 consegue varrer grande parte das estruturas cristalográficas, como esperado. Entretanto, observa-se que

não há sobreposição de pontos entre a simulação da estrutura referência (verde) com a simulação da na condição 1 (laranja).

Figura 6– Gráfico da Análise de Componente Principal. Em verde os frames da cMd controle. A estrutura do cristal 3NF3 está em vermelho. Em laranja e roxo, as cMD na condição 1 e a condição 2, respectivamente. O cristal 5JDS está em marrom e as demais estruturas do PDB estão em preto.



Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível inferir que existe um impedimento conformacional bloqueando a transição entre as posições. Isso indica a possibilidade de que haja uma barreira energética que impeça a mudança. Como a frequência de choques tem influência na termalização do sistema (LONCHARICH; BROOKS; PASTOR, 1992; RHEE; PANDE, 2008), a condição 2 foi gerada para analisar o comportamento espacial da proteína mediante aumento na cinética das moléculas de solvente. Foi observado que a mudança na frequência de choques faz com que os frames da condição 2 consigam atingir um patamar conformacional que é menos favorável ao sistema, indicando que é possível acessar posições de transição caso haja aplicação de um potencial cinético maior.

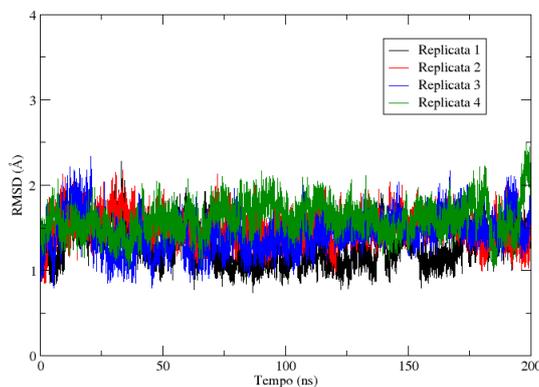
Diante disso, avaliamos o desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) da cadeia principal das conformações da proteína acessadas durante as simulações em relação à estrutura inicial, para avaliar se houve uma mudança brusca na estrutura proteica.

Conforme mostrado na Figura 7, o RMSD das amostras não indica instabilidade, visto que a média é mantida por toda simulação. Na condição 1, as amostras se mantiveram estáveis em torno de 1,5Å durante a simulação. Na condição 2, uma das

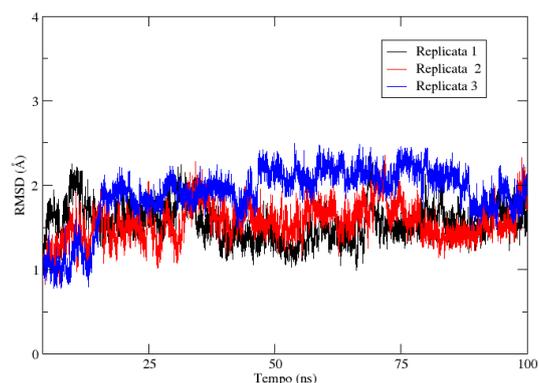
replicatas se destacou em relação às demais. A Replicata 3 (em azul) teve suas amostras com conformação mais distantes da estrutura referência, por volta de 2Å.

Figura 7– Desvio Quadrático Médio. Condição 1. (a) e (b) condição 2, replicatas 1, 2, 3 e 4 representadas respectivamente nas cores preto, vermelho, azul e verde.

a.



b.

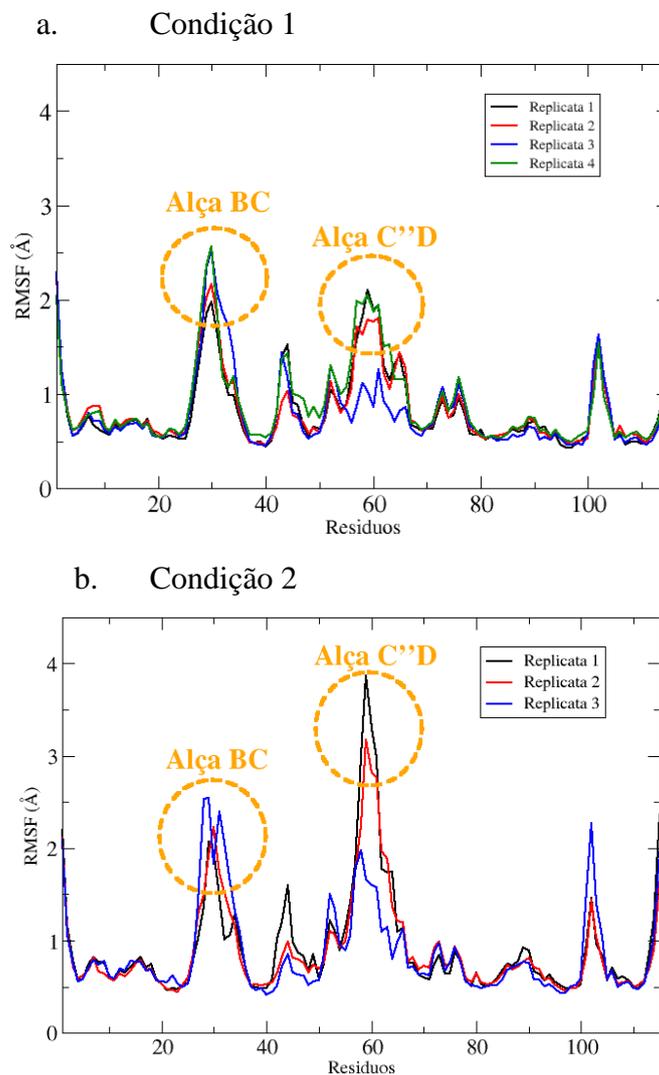


Fonte: Elaborada pelo autor.

Desse modo, olhamos para a contribuição por resíduo na mobilidade da PD-L1 por meio da Flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*). As regiões correspondentes aos dois grandes picos na Figura 8 são regiões de alça, chamadas Alça BC e Alça C''D (Figura 8), respectivamente.

Como esperado, as replicatas da condição 1 possuem um padrão comum entre as amostras, apesar de haver diferença na replicata 3 (Figura 8, em azul), o que indica que nesta replicata houve uma contribuição menor da alça C''D na movimentação da proteína. Na condição 2 apenas uma replicata difere das demais (Figura 8.b, em vermelho), apesar de ter um padrão semelhante com a condição 1.

Figura 8— Gráfico da Flutuação Quadrática Média. Condição 1 (a) e condição 2. Replicas 1, 2, 3, e 4 em preto, vermelho, azul e verde, respectivamente. As estruturas em alça estão destacadas em laranja



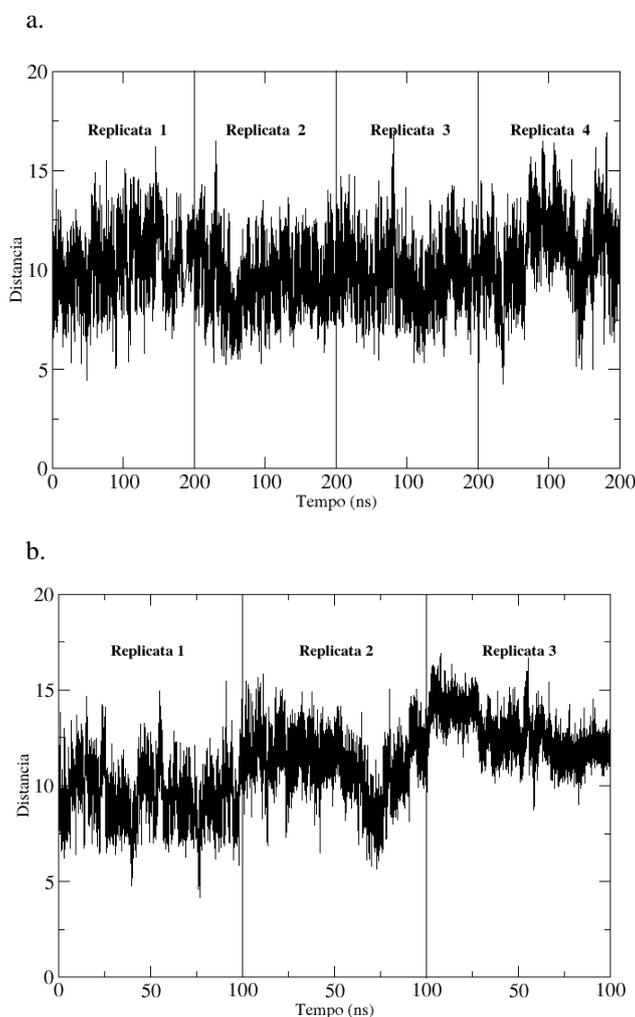
Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando o movimento da proteína durante a simulação, vemos que a principal modificação visual da 5JDS é o posicionamento das alças, mesmo que não esteja explícito se há relação direta entre o movimento das duas simultaneamente, ou se essa correlação não existe. O comportamento visto na Figura 8, associado com a posição dos frames durante a simulação (Figura 6), confirma que o movimento das alças é um dos principais fatores para que haja transição entre as conformações da PD-L1, o que sugere também que a mobilidade da alça C'D tenha maior influência na flexibilidade da proteína.

Diante desse dado, as alças se tornaram prioritárias no estudo da flutuação da PD-L1. Apesar de serem naturalmente flexíveis, a variação conformacional de alças é

importante na regulação da atividade de enzimas (LI et al., 2016) e em interações proteína-proteína (JUBB; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Figura 9– Distância (Å) entre os resíduos Lys27 e Ser 74 da PD-L1 em função do tempo de simulação para a A) condição 1 e B) condição 2. Barras verticais indicam separação entre replicatas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

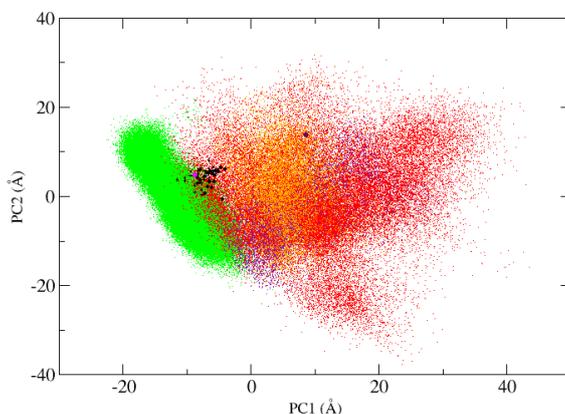
Foi mensurada a distância entre dois pontos na proteína para análise da alça BC, os resíduos selecionados, Lys29 presente na alça (alta flutuação) e Ser76 como ponto de referência estático (baixa flutuação). O cálculo de distância nos fornece a amplitude do deslocamento da alça, indicando o movimento de abertura da estrutura para cada replicata da simulação.

A Figura 9 mostra o resultado obtido pelo cálculo da amplitude assumida por cada frame obtido durante a simulação. A condição 1 possui um padrão semelhante para cada deslocamento entre as amostras (Figura 9.a), o que condiz com o gráfico de RMSF (Figura 8.a). O fato da condição 2 possuir uma das replicatas diferente das demais confirma a importância da abertura da alça para a flexibilidade e estabilidade da PD-L1.

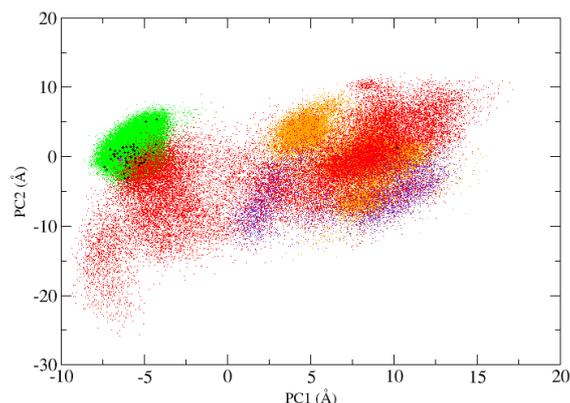
A replicata 3 da condição 2 possui um deslocamento em torno de 13Å, provavelmente devido à interação da alça com o resíduo Thr102 (Figura 8), que se encontra na volta entre duas fitas beta.

Até então, os dados sugerem que, em conjunto, o arranjo tridimensional da proteína como um todo é capaz de modular essa variação. Um deslocamento maior na alça BC, bem como a oscilação acentuada de uma estrutura rígida na proteína podem indicar a necessidade da interação desses resíduos para conter o movimento da proteína, de forma que a transição entre conformações exija adição energética.

Figura 10– Gráfico da Análise de Componente Principal da PD-L1 completa (a) e da alça C'D (b). Em verde os frames da cMd, a estrutura do cristal 3NF3 está em rosa. Em laranja e roxo, as cMD na condição 1 e a condição 2, respectivamente. A aMD disposta em vermelho. As demais estruturas do PDB estão em preto.



a.



Fonte: Elaborada pelo autor.

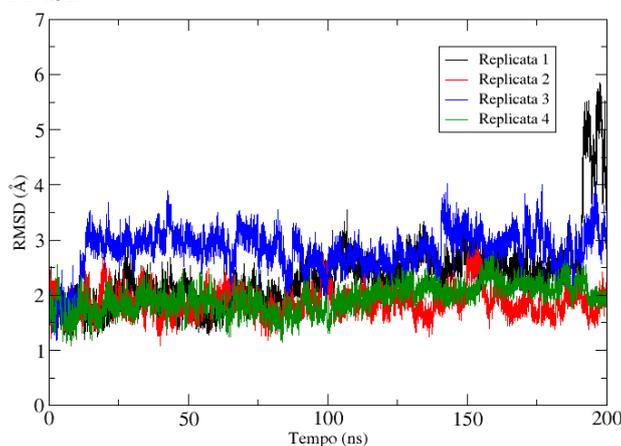
Mínimos de energia podem ser ultrapassados com o auxílio da simulação de dinâmica molecular acelerada (aMD), por exemplo. Esse método permite o aumento da amostragem do espaço conformacional varrido pelos frames, por fornecer um impulso energético durante o cálculo. Na Figura 10, onde é vista a comparação do espaço amostral entre as simulações convencionais (cMD) e aMD, é possível observar que a aMD

proporcionou o aumento de configurações adotadas pela PD-L1, permitindo que conformações menos favoráveis fossem alcançadas durante a simulação. Os frames obtidos na simulação acelerada conseguiram sair do ponto inicial correspondente à 5JDS e alcançar o espaço aproximado obtido pela simulação com a 3FN3 (Figura 10).

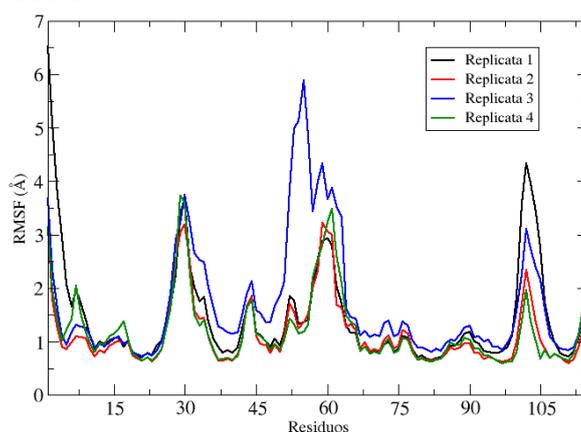
A análise do RMSD e RMSF da aMD (Figura 11) foi um indicativo para compreender a influência da alça C''D para a diferença entre as conformações assumidas pela PD-L1. O RMSF demonstra que a alta flutuação da alça C''D permite que a proteína vasculhe espaços conformacionais antes não acessados. Para entender a contribuição da alça C''D na flexibilidade, foi realizada uma PCA com seleção apenas dos resíduos correspondentes a essa região (Figura 10.b).

Figura 11– A) Desvio e B) Flutuação Quadrática Média da aMD.

a. RMSD



b. RMSF



Fonte: Elaborada pelo autor.

A PCA com resíduos apenas da alça C''D mostra com maior clareza a diferença entre as simulações realizadas. A grande maioria dos cristais encontrados no PDB estão alocadas espacialmente no mesmo cluster, de modo que todas as estruturas são varridas pela simulação controle da 3FN3. No outro ponto do gráfico se encontram

as duas simulações da cMD da 5JDS, separadas por espacialmente. Como a dinâmica acelerada possibilitou varrer todo o espaço da PCA não acessados pela cMD, é possível inferir que existe uma barreira de potencial entre os dois estados, de modo que uma flutuação maior da alça C''D é crucial para a transição entre conformações.

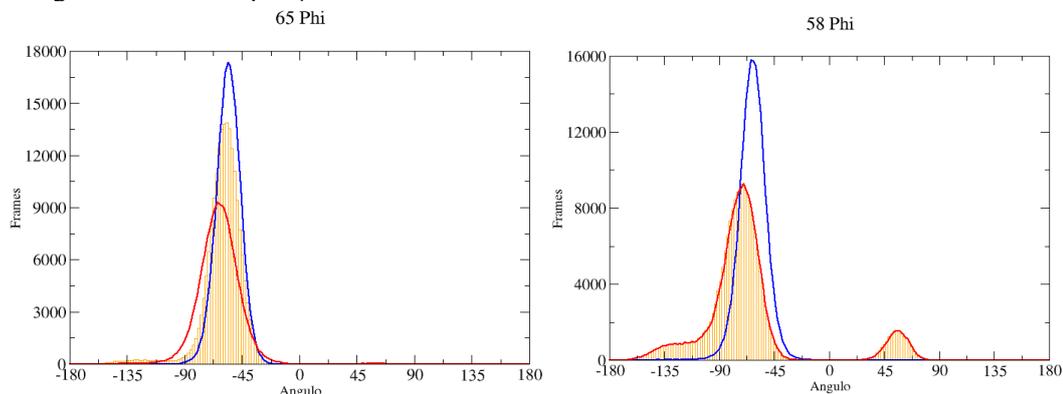
Os dados de RMSD e RMSF da dinâmica acelerada mostram que as replicatas mantiveram o RMSD por volta de 2 Å (Figura 11.a), o que indica estabilidade durante a simulação. A Figura 11, em azul, mostra uma replicata que se comporta diferente das demais, esta corresponde aos frames que mais se aproximaram da simulação da 3FN3. Um RMSD por volta de 3Å e uma análise visual do RMSF da replicata 3 sugere que a contribuição da alça C''D é mais determinante para diferenciação entre as estruturas da PD-L1, em relação à alça BC. Apesar de contribuir para a flutuação da replicata 1, não é possível inferir que o resíduo Thr102 seja importante na variação de conformação da PD-L1. Seu comportamento se manteve dentre as replicatas mais estáveis (Figura 8). A região varrida pelas conformações da PD-L1 na dinâmica acelerada (Figura 10, em vermelho) é capaz de cobrir a maioria dos frames alcançados pela flutuação da simulação da 5JDS, bem como as demais estruturas cristalográficas dos PDBs (Figura 10, em preto). Saber o valor dos diedros nessas posições fornece bases sobre a torção necessária para percorrer o amplo conjunto estrutural termodinamicamente acessível da proteína PD-L1.

Diante disso, foi feito um histograma da distribuição dos ângulos Phi (Φ) e Psi (ψ) da cadeia principal dos resíduos da alça que mais diferiram entre as condições, os resíduos no intervalo entre 56 e 58 e 64 e 67. Comparando as diferentes simulações, foi possível observar na Figura 12 três padrões distintos entre os ângulos. Primeiro, a total sobreposição de valores (Figura 12.a). Os diedros posicionados nos mesmos valores não são capazes de discriminar os diferentes grupos estudados, visto que se encontram nos mesmos valores. Esse perfil foi obtido para os ângulos 56Φ , 56ψ , 57Φ , 58Φ , 64Φ , 64ψ , 65Φ , 67Φ e 67ψ . Diante disso, os ângulos citados foram retirados da análise.

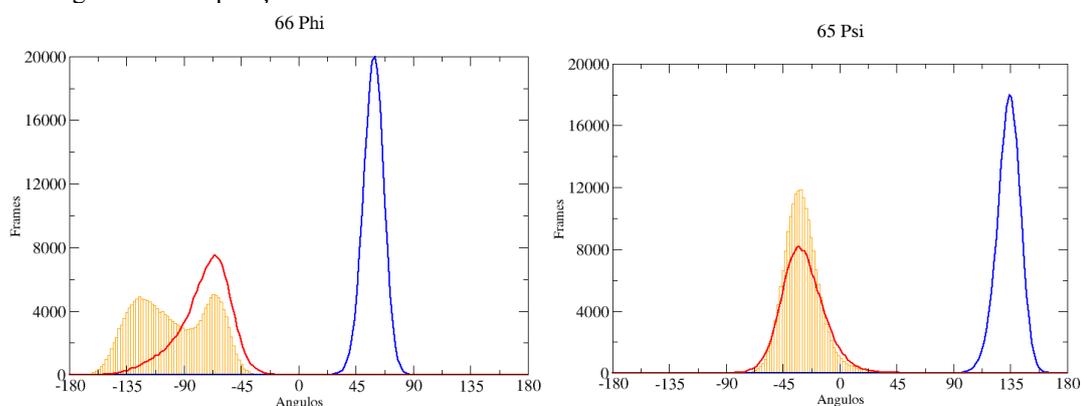
Um segundo padrão observado são ângulos obtidos apenas pela aMD e as dinâmicas convencionais da 5JDS, sem conexão alguma com a dinâmica da 3FN3. Esse padrão é interessante para distinguir a posição dos resíduos varridos apenas pelos frames da dinâmica controle (Figura 10 em verde). Esse dado revela configurações não obtidas por ambas as simulações da 5JDS e indica que PD-L1 possui um rearranjo conformacional que necessita de uma mudança aparente na conformação da alça. Esse padrão foi observado para os ângulos 65ψ , 66Φ e 66ψ .

Figura 12– Distribuição de diedros específicos da PD-L1. Dados da simulação controle, cMD e aMD em azul, laranja preenchido e vermelho, respectivamente.

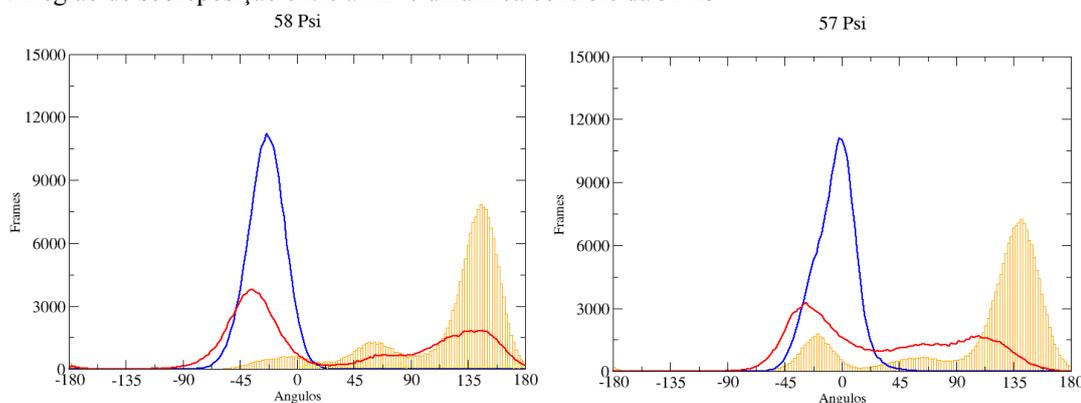
a. Região de total sobreposição



b. Região de sobreposição entre aMD e cMD



c. Região de sobreposição entre aMD e dinâmica controle da 3FN3



Fonte: Elaborada pelo autor.

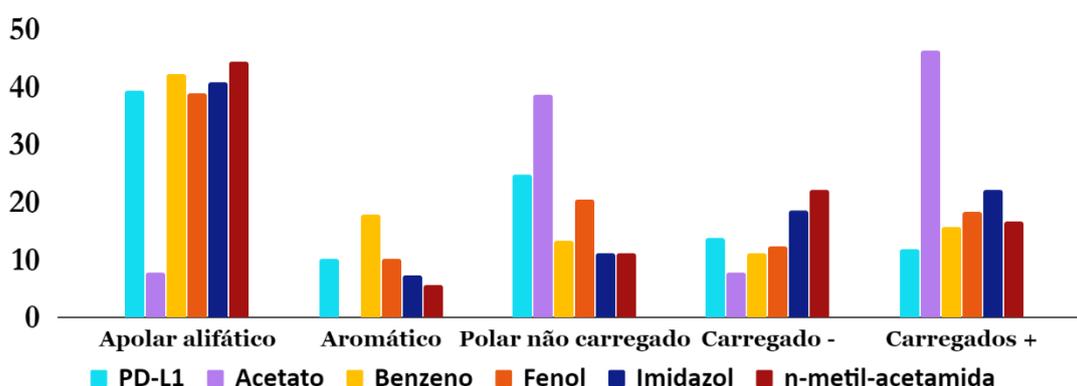
O último padrão observado foram regiões de sobreposição entre aMD e a dinâmica controle (Figura 12.c) e ausência de sobreposição com cMD. Esse padrão descreve o ângulo necessário para que a conformação assumida pela 5JDS possa ultrapassar a barreira energética e alcançar as demais estruturas encontradas no PDB. Esse padrão foi observado apenas pelos resíduos 57 ψ e 58 ψ . É possível destacar a importância dos ângulos 65 ψ , 66 Φ , 66 ψ , 57 ψ e 58 ψ como determinantes para a descrição da diferença estrutural entre 5JDS e os demais cristais encontrados no PDB. A compreensão do

comportamento da PD-L1 nos permite entender o sistema em questão para posteriormente usá-lo como subsídio para vasculhar novas regiões de interação, em especial, sítios crípticos.

4.2 Co-solvente na busca de cavidades na PD-L1

As sondas foram escolhidas de acordo com características químicas, de modo que a proteína fosse varrida por moléculas de diferentes graus de polaridade, diferentes tamanhos de estrutura ou com ausência/presença de carga. A Figura 13 mostra a porcentagem de resíduos acessados pelas sondas, também usando o mesmo critério de polaridade e carga. A grande maioria dos ligantes interagiram com resíduos apolares alifáticos, característica que se espera ser útil para induzir exposição de ambientes químicos desfavoráveis para a água.

Figura 13. Resíduos acessados de acordo com características químicas (%)



Fonte: Elaborado pelo autor.

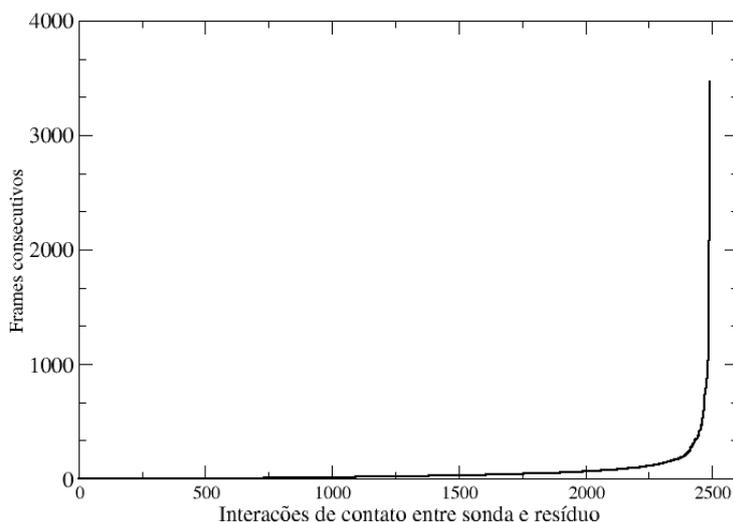
Benzeno e fenol varreram toda a superfície da porção IgV da PD-L1, prioritariamente interagindo com resíduos apolares, no qual são de mesma natureza química dos resíduos que fazem parte da superfície de interação PD-1/ PD-L1 (AHMED; BARAKAT, 2017b). Acetato não seguiu esse mesmo comportamento por ser uma estrutura carregada negativamente, o que condiz com a preferência de acesso a resíduos carregados positivamente ou resíduos polares.

Analisando as interações entre sonda e proteína, foi observado que alguns resíduos foram acessados com maior frequência do que qualquer outra região da proteína. Estes foram chamados de *hotspots*. Ao agrupar resíduos por proximidade estrutural, estaremos tratando de um sítio de interação e também organizando de acordo com a estrutura física desse sítio. A primeira situação em comum, então, seria a de resíduos

sendo altamente acessados por várias moléculas de co-solvente, simultaneamente ou não. Isso significa que um número indefinido de sondas é atraído pela cadeia lateral dos aminoácidos, mesmo que a interação não seja estável.

A segunda situação se refere ao tempo de contato consecutivo entre o co-solvente e um resíduo. Nesse caso, leva-se em consideração os eventos cujo o ligante fica durante grande parte da simulação acomodado no ambiente químico fornecido por uma região da proteína. O critério para permanência da sonda é equivalente à afinidade da sonda ao resíduo ou a um conjunto destes. Para uma simulação de 50ns, foi necessário determinar um valor que indicasse estabilidade da ligação, ou seja, permanência do contato sonda/ligante. A Figura 14 mostra o número de frames consecutivos que cada sonda permaneceu em contato com um resíduo da proteína.

Figura 14– Somatório de contatos entre sonda/ resíduo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico traz todas as combinações possíveis entre os resíduos da proteína (115) com as sondas presentes durante a simulação. No eixo y, essa informação se encontra ordenada pelo total de frames consecutivos que esse contato se manteve. Os resíduos encontrados a partir do ponto de inflexão do gráfico são aqueles cujo o ligante teve maior preferência em acessar durante a MD (hotspot). Baseado na Figura 14, utilizamos um mínimo de 1000 frames consecutivos para determinar um hotspot, utilizando um valor que pudesse ser comum entre os cinco co-solventes utilizados, de modo que não superestimasse o número de regiões estáveis de contato. Esse valor corresponde a um tempo de 5 ns de simulação.

Tabela 1 Número de hotspots

Sonda	Hotspots
Acetato	13
Benzeno	45
Fenol	49
Imidazol	27
n-metil- acetamida	18

Fonte: Elaborado pelo autor.

O número de hotspots encontrados por cada sonda se encontra na Tabela 1, onde benzeno e fenol se destacam pela alta acessibilidade à PD-L1, sendo capaz de varrer quase metade do total de resíduos e se manter estável nestes por mais de 5 ns de simulação. Os demais co-solventes obtiveram valores mais discretos. Os resíduos selecionados na Tabela 1 foram ordenados de acordo com a disposição espacial na proteína, a fim de facilitar a busca por sítios críticos. Para estes, foi extraído o somatório de frames onde havia presença do contato ligante/resíduo. As Tabelas 2 e 5 mostram a frequência com que a cadeia lateral da proteína foi acessada (região colorida), apenas para os resíduos cujo a sonda teve uma interação estável (hotspots).

Tabela 2. Somatório de contatos por hotspots agrupados – Contatos comuns. O aumento da intensidade da cor vermelha reflete no aumento do número de frames em que a sonda teve contato com o resíduo por replicata (R).

a. Replicatas da simulação com benzeno

Hotspot	R1	R2	R3	R4	R5	R5	R7	R8	R9	R10
37	12333	14743	21634	19277	15938	15606	12253	14373	5813	10293
98	18528	14847	14981	22181	23475	23422	20767	14198	8958	16644
100	8354	16301	13392	11732	7456	7570	7824	8761	6012	5543
104	9757	19229	14406	15204	11721	11374	10838	10094	7836	7814

b. Replicatas da simulação com fenol

Hotspot	R1	R2	R3	R4	R5	R5	R7	R8	R9	R10
37	31532	15716	18453	26365	11105	14564	13525	12696	10588	12914
39	24817	13872	18518	19180	12529	13591	10001	12805	16415	16973
51	17271	6085	12881	13484	5506	9362	7896	7709	4593	7469
98	29981	14655	21002	22674	17581	17694	12628	16039	18854	24638

Fonte: Elaborado pelo autor.

A frequência foi distribuída de acordo com os valores encontrados em cada uma das 10 replicatas. Os *hotspots* foram organizados por proximidade, de acordo com a interação em conjunto, de modo que um cluster de interação é formado quando os resíduos atuam em conjunto para formar um ambiente químico favorável para atração e estabilidade da sonda na região durante a simulação, como é possível ver para Ile37, Met98, Ser100 e Ala104 (tabela 4.a) ou em Ile37, Val51, Tyr39 e Met98 (Tabela 2.b). Ambos os casos se referem à uma região de superfície exposta da proteína, facilmente acessada, o que pode ser caracterizado como um evento frequente ou comum. Como a abertura de um sítio críptico é um evento raro, ou seja, de baixa ocorrência na natureza, focamos as buscas em situações cujo agrupamento aparecesse mais acessado em poucas replicatas. Esses eventos raros estão exemplificados na Tabela 3.

Tabela 3. Somatório de contatos por hotspots agrupados – Contatos raros.

a. Replicatas da simulação com benzeno										
Hotspot	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
8	1540	1047	4507	1393	1588	1377	629	1072	922	9982
11	357	568	4123	1212	818	990	408	244	563	10289
21	29	26	3211	158	16	255	46	24	101	8802
22	2609	923	6055	3852	1389	2542	387	1494	2310	13425
7	3648	1667	6235	4862	2387	1545	487	1484	2000	15804
b. Replicatas da simulação com n-metil-acetamida										
Hotspot	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
41	3035	9890	2698	1148	2439	8897	2070	789	1805	4376
43	3128	9031	3236	1733	3198	6905	449	749	1470	4639
94	4001	9708	5092	2379	4183	7802	1010	972	2488	5164
96	4379	11425	4278	2627	3503	10804	3945	2077	3171	6784

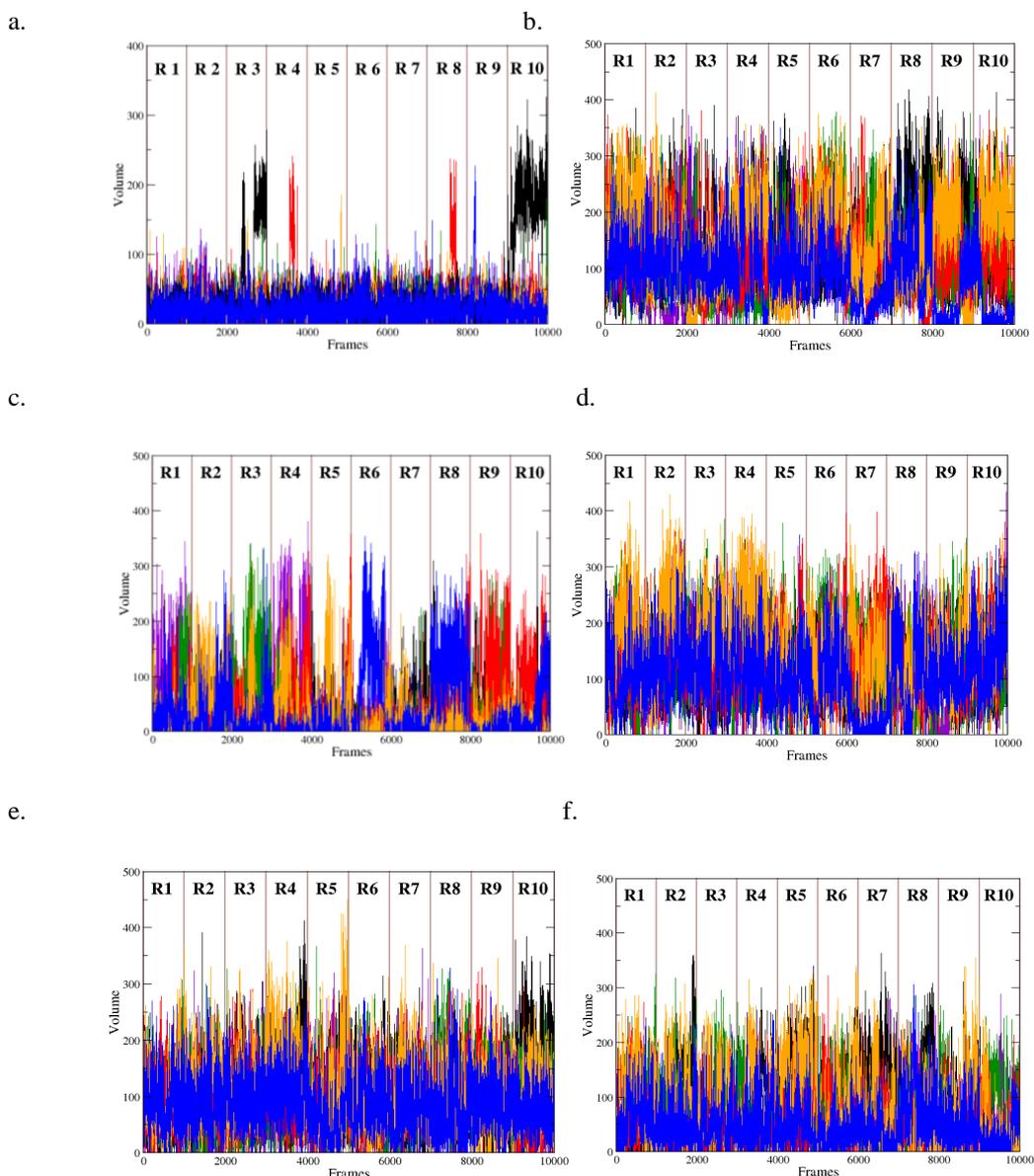
Fonte: Elaborado pelo autor

De fato, foi observado que algumas regiões da PD-L1 só abriam quando condições específicas aconteciam. Por exemplo, o agrupamento Lys8, Tyr11, Ile21, Glu22, Pro7 (Tabela 3.a) só era acessado quando havia interação entre um benzeno com a cadeia principal dos resíduos Lys8 e Tyr11, abrindo espaço para um benzeno secundário acessar a região compreendida pelos resíduos acima citados.

Com dados de resíduos mais acessados, tinha-se um indício de quais regiões eram possíveis sítios crípticos. Para ratificar as cavidades, foi usado o programa Fpocket, no módulo mdpocket. Foram rodadas no programa as simulações de todos os co-solventes trabalhado e uma simulação só com água, para ter um controle negativo de formação de cavidade estável. O programa vasculhou por cavidades transientes e forneceu regiões de frequência e densidade de alfa esferas para cada uma das simulações. Regiões de

sobreposição com o grid da água foram desprezadas, para validação de região onde apenas o ligante é capaz de acessar.

Figura 15– Volume das cavidades selecionadas durante a simulação de 50ns. Em violeta acetato, água em azul, benzeno em preto, fenol em laranja, imidazol em verde e n-metil-acetamida em vermelho. Cada gráfico corresponde a uma cavidade sugerida pelo fpocket.



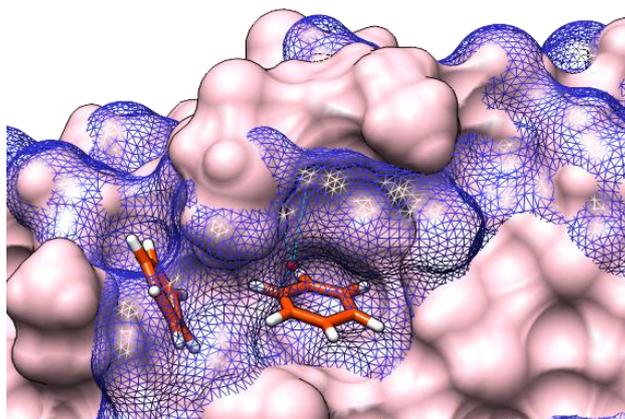
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 15 mostra o volume das cavidades sugeridas pelo mdpocket. Cada cavidade foi selecionada de acordo com o comportamento da proteína durante toda a simulação, visualizada em todas as replicatas. Regiões não acessadas pela água durante a simulação, mas que possuem abertura com outro ligante possuem alta chance de serem um sítio críptico. A água consegue acessar grandes volumes na maioria das simulações, permanecendo em baixos volumes apenas nas cavidades representadas em Figura 15.a e

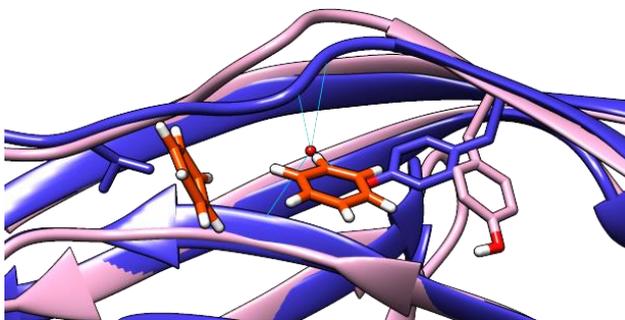
Figura 15.c. Resultados sobre a interação sonda/resíduo mostraram duas regiões prováveis de haver formação de cavidade, através da simulação com benzeno ou n-metil-acetamida (Tabela 3).

Figura 16– Sítio críptico na PD-L1. A conformação com cavidade aberta se encontra em rosa, com benzeno em laranja posicionado no sítio. A representação da superfície da estrutura inicial da simulação está disposta em grade na cor azul.

a.



b.



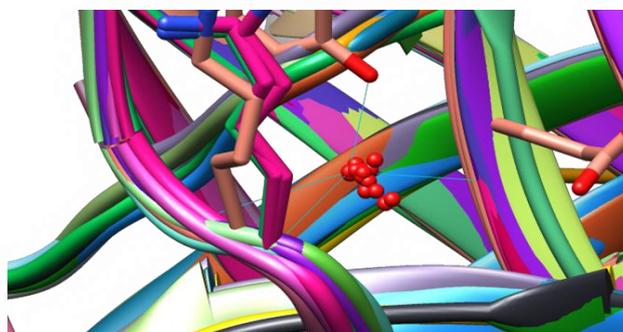
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o benzeno, isso foi confirmado através do fpocket, com a formação de uma cavidade (Figura 15.a) onde a água acessou em apenas na replicata 9, mas não conseguiu se manter no *pocket*, descrevendo com alta verossimilhança o comportamento de um sítio críptico. Em poucas simulações há a abertura da cavidade, mas o ligante consegue se manter durante o resto da simulação. O pocket selecionado na Figura 15.a diz respeito ao mesmo representado por Lys8, Tyr11, Ile21, Glu22, Pro7 (Tabela 2B.a), confirmando a existência de um sítio críptico na PD-L1 (demonstrado na Figura 16).

A Figura 16 demonstra duas formas de visualização do sítio críptico encontrado. A representação em superfície mostra a formação da cavidade (em rosa) comparada com a cavidade fechada (grade em azul). Na estrutura em linha (Figura 16.b)

é possível ver o deslocamento da Tyr11 para entrada do benzeno na cavidade. Para os demais pockets, é necessário realizar mais estudos. Na representação do cristal da 5JDS (Figura 16 em azul) é possível observar a presença de uma água. Isso significa que, mesmo com o sítio fechado, uma molécula de água conseguiu se acomodar na região. Foi levantada a hipótese de que a proteína possuía uma água estrutural para manutenção da estabilidade. Diante disso, foi feita uma análise comparando todas as estruturas cristalográficas presentes no PDB. A Figura 17 mostra o alinhamento dos cristais, revelando que, de fato, uma molécula de água consegue acessar a região do sítio.

Figura 17. Alinhamento das estruturas cristalográficas de PD-L1 disponíveis no PDB em relação à presença de água (representação em forma de esfera vermelha).



Fonte: Elaborado pelo autor.

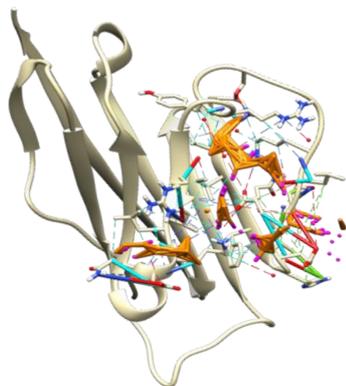
Dos cristais comparados, cerca de metade destes haviam a presença da água na estrutura, revelando que a molécula não era essencial para manutenção da estabilidade proteica da PD-L1. Porém, a presença da água indica fortemente que o sítio se abre - mesmo que temporariamente - independentemente do tipo de ligante que está atracado com a proteína, assim como independe da região em que este está interagindo.

O programa Fpocket também forneceu uma série de regiões e suas respectivas probabilidades de se tornar um alvo para pequenas moléculas (drugscore). Nós comparamos as informações geradas entre o cristal 5JDS e o frame onde o sítio crítico alvo adquiriu maior volume (frame 9691). Para a estrutura na sua conformação natural - imersa apenas em água - foi possível encontrar dois sítios principais, com drugscore semelhante, em torno de 0,38. O valor do drugscore varia entre 0 e 1, demonstrando que os sítios encontrados no cristal são de baixo interesse para desenho de alguma molécula alvo. No frame 9691 da simulação com benzeno, porém, foram encontrados oito sítios de possível interação. Inicialmente, foi suposto que a cavidade gerada possuía um volume

limitado, porém o programa definiu a região como uma área que cruza toda a proteína, correspondente à porção indicada com esferas em verde (Figura 18.b).

Figura 18. Regiões de alta probabilidade de interação fornecidas pelo Fpocket.

a.



Sítio 1 – 0,4
Sítio 2 – 0,357

b.



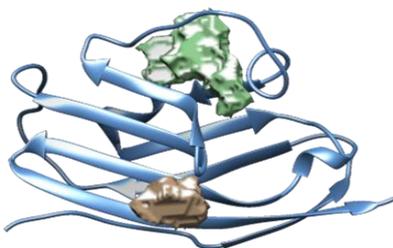
Sítio 1 – 0,905 **Sítio 4** – 0,088 **Sítio 7** – 0,064
Sítio 2 – 0,021 **Sítio 5** – 0,051 **Sítio 8** – 0,03
Sítio 3 – 0,033 **Sítio 6** – 0,083

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para checar a coerência do resultado, o programa DogSite foi usado com o mesmo propósito para busca de regiões favoráveis de interação. Na Figura 19 estão dispostos os resultados da triagem de sítios, conforme foi feito anteriormente.

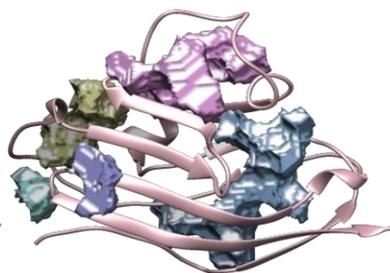
Figura 19. Regiões de alta probabilidade de interação fornecidas pelo DogSite

a.



Sítio 1 – 0.707
Sítio 2 – 0.207

b.



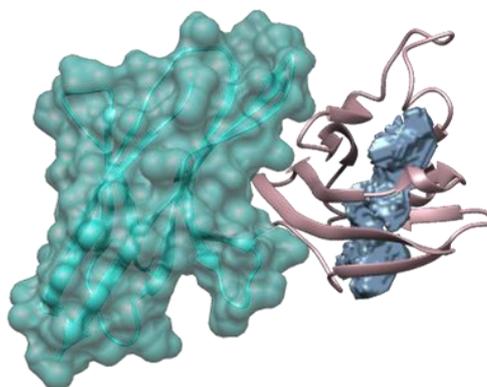
Sítio 1 – 0.693 **Sítio 4** – 0.184
Sítio 2 – 0.825 **Sítio 5** – 0.235
Sítio 3 – 0.600

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a estrutura 5JDS também foram encontradas duas principais regiões alvo, com pontuação de 0,7 para uma das alças. Para o frame 9691 foram encontradas cinco regiões alvo, dentre eles a região correspondente ao sítio crítico encontrado

utilizando o Fpocket (em azul), revelando que a região alvo encontrada pela simulação com co-solvente corresponde à uma região que envolve toda a extensão da proteína PD-L1. O programa também avaliou a região com alto valor de drugscore, obtendo pontuação de 0,825. Os dois programas indicam que a região encontrada é bastante promissora como alvo para direcionamento de fármacos. Ambos também revelam que a cavidade exposta possui um volume que atravessa toda a proteína, mostrando que moléculas apolares – característica química do benzeno, co-solvente usado na simulação dessa cavidade – são eficientes para induzir a abertura de novas regiões de interação.

Figura 20. Disposição tridimensional da PD-L1 (em rosa) ligada com a proteína PD-1 (em ciano). Em azul está disposta a região correspondente a sítio críptico.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 20 mostra a localização espacial do sítio (Pro7, Lys8, Tyr11, Ile21, Glu22) na PD-L1, frente à PD-1, mostrando que não há sobreposição entre os sítios de interação. Em geral, os anticorpos desenvolvidos para bloquear a interação PD-1/PD-L1 interagem em cinco hotspots: Tyr56, Glu58, Arg113, Met115 e Tyr123, presentes na porção CC'FG da PD-L1, são resíduos cruciais também para a interação com a PD-1 (LEE; LEE; HEO, 2019), de forma que os inibidores da ligação PD-1/ PD-L1 são eficazes por competir com PD-1 pelo sítio de ligação. O sítio críptico encontrado não é na mesma que região PD-1, sendo promissor para regulação alostérica no desenho de novos fármacos.

5 CONCLUSÃO

A dinâmica molecular permitiu vasculhar as diversas possibilidades de conformação, dando suporte para descrever o espaço conformacional do sistema. O fato de haver uma separação visualmente clara entre a amostragem das dinâmicas realizadas indica fortemente que exista uma barreira que impeça que a proteína assuma tal conformação obtida na estrutura cristalográfica 5JDS. Isso talvez tenha sido possibilitado pela presença do nanocorpo co-cristalizado com a estrutura. Nossos dados demonstram o impacto que essa ligação pode causar na proteína. Alterações nas proximidades dos resíduos 30 e 60 da proteína PD-L1 se mostraram chave para que a proteína pudesse saltar a barreira potencial. Esses dados são corroborados tanto pela análise individual dos aminoácidos (RMSF), como análise do deslocamento e flexibilidade da proteína (RMSD). Aparentemente, as conformações estão propensas à alteração do estado conformacional mediante ligante (proteína ou pequenas moléculas) e isso tem relação com a energia envolvida nos diversos tipos de ligação. Os dados de diedros atestaram diferenças nos espaços conformacionais varridos pelas diferentes simulações, descrevendo quais resíduos são mais influentes em cada condição.

Em consonância, o uso de co-solvente se mostrou uma boa estratégia para vasculhar cavidades na PD-L1. Sondas aromáticas foram mais eficientes em propor sítios de interação, em especial a região de interface com PD-1. Afunilando para o caso de sítios críticos, com o auxílio do fpocket, foram encontradas uma série de regiões com abertura de cavidade com condições químicas específicas, dentre essas, foi encontrada uma cavidade promissora para o planejamento racional de fármacos, representada pelos resíduos Lys8, Tyr11, Ile21, Glu22, Pro7. Essa região não demonstra estabilidade quando abertura na presença de água, necessitando de um ligante para manter a conformação, caracterizando como um sítio crítico. Uma análise visual da cavidade mostrou a indução de uma abertura de grande volume e os dados de *score druggability* realizados por dois programas distintos mostraram que a região possui alta chance de ser usada como alvo para desenho racional de fármacos ou atracamento de ligante inibitório. Uma análise comparativa do posicionamento do sítio frente ao posicionamento da PD-1 revela que não há sobreposição de regiões, o que indica o possível uso para regulação alostérica.

Esses dados dão suporte para a compreensão do comportamento da PD-L1, com base na proteína ser um excelente alvo para desenvolvimento de fármacos, novas regiões podem ser exploradas para aumentar a variabilidade de imunoterápicos disponíveis.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.; BARAKAT, K. The Too Many Faces of PD-L1: A Comprehensive Conformational Analysis Study. **Biochemistry**, v. 56, n. 40, p. 5428–5439, 10 out. 2017a.
- AHMED, M.; BARAKAT, K. The Too Many Faces of PD-L1: A Comprehensive Conformational Analysis Study. **Biochemistry**, v. 56, n. 40, p. 5428–5439, 10 out. 2017b.
- ANTONIA, S. J. et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 20, p. 1919–1929, 16 nov. 2017.
- BELLMUNT, J. et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 11, p. 1015–1026, 16 mar. 2017.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BRENTJENS, R. J. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. **Science translational medicine**, v. 5, n. 177, p. 177ra38, 20 mar. 2013.
- CASE, D. et al. **The Amber Molecular Dynamics Package**. Disponível em: <<https://ambermd.org/>>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- CHOUAIB, S. et al. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 2, p. 1172–9, 1 ago. 1985.
- DAËRON, M. et al. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. **Immunological Reviews**, v. 224, n. 1, p. 11–43, 1 ago. 2008.
- ESCORS, D. et al. **The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2018.
- Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. . Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

- GANDINI, S.; MASSI, D.; MANDALÀ, M. **PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis***Critical Reviews in Oncology/Hematology* Elsevier Ireland Ltd, , 1 abr. 2016.
- GURAM, K. et al. **A threshold model for T-cell activation in the era of checkpoint blockade immunotherapy***Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2019.
- HARZSTARK, A. L.; SMALL, E. J. Sipuleucel-T. **Drugs in R & D**, v. 7, n. 3, p. 197–201, 2006.
- INABA, K. et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 6, p. 927–36, 20 mar. 2000.
- JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.
- JUBB, H.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. Flexibility and small pockets at protein–protein interfaces: New insights into druggability. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 119, n. 1, p. 2–9, 1 out. 2015.
- KAUFMAN, H. L. et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 10, p. 1374–1385, 1 out. 2016.
- KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 27 abr. 2008.
- KIM, D. et al. Pocket extraction on proteins via the Voronoi diagram of spheres. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 7, p. 1104–1112, 1 abr. 2008.
- KIM, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 8 jan. 2019.
- KOBLISH, H. K. et al. Hydroxyamidine Inhibitors of Indoleamine-2,3-dioxygenase Potently Suppress Systemic Tryptophan Catabolism and the Growth of IDO-Expressing Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 489–498, 1 fev. 2010.
- LE GUILLOUX, V.; SCHMIDTKE, P.; TUFFERY, P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 168, 2 jun.

2009.

LEE, H. T.; LEE, S. H.; HEO, Y.-S. Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 6, 26 mar. 2019.

LESOKHIN, A. M. et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2698–704, 10 ago. 2016.

LI, C. et al. Conformational Flexibility of a Short Loop near the Active Site of the SARS-3CL_{pro} is Essential to Maintain Catalytic Activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20918, 16 ago. 2016.

LONCHARICH, R. J.; BROOKS, B. R.; PASTOR, R. W. Langevin dynamics of peptides: The frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanyl-N'-methylamide. **Biopolymers**, v. 32, n. 5, p. 523–535, 1992.

MAIER, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–713, 11 ago. 2015.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–489, 21 dez. 2011.

MESQUITA JÚNIOR, D.; SILVA, N. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 522–580, 2010.

MICHOT, J. M. et al. **Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review** **European Journal of Cancer** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2016.

MIGDEN, M. R. et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 4, p. 341–351, 26 jul. 2018.

MOMTAZ, P.; POSTOW, M. A. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. **Pharmacogenomics and personalized medicine**, v. 7, p. 357–65, 2014.

- NALL, R. **Cancer: Overview, causes, treatments, and types**. Disponível em: <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648.php>>. Acesso em: 1 abr. 2019.
- OISETH, S. J.; AZIZ, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 3, n. 10, p. 250, 31 out. 2017.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 1 out. 2004.
- PHARES, T. W. et al. Target-Dependent B7-H1 Regulation Contributes to Clearance of Central Nervous System Infection and Dampens Morbidity. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5430–5438, 1 maio 2009.
- PORTER, D. L. et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 725–733, 25 ago. 2011.
- RHEE, Y. M.; PANDE, V. S. Solvent Viscosity Dependence of the Protein Folding Dynamics †. 2008.
- RITTMAYER, A. et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 255–265, 21 jan. 2017.
- ROSTKOWSKI, M. et al. Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. **BMC Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 6, 26 jan. 2011.
- SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 198–210, 1 mar. 2013.
- SCHUSTER, M.; NECHANSKY, A.; KIRCHEIS, R. Cancer immunotherapy. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 138–147, 1 fev. 2006.
- SCHWARTZENTRUBER, D. J. et al. gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 22, p. 2119–2127, 2 jun. 2011.
- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6230, p. 56–61, 3 abr. 2015.

- SHARPE, A. H. Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy. **Immunological reviews**, v. 276, n. 1, p. 5–8, 2017.
- SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD-1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 3, p. 153–167, 13 mar. 2018.
- SHKURTI, A. et al. pyPcazip: A PCA-based toolkit for compression and analysis of molecular simulation data. **SoftwareX**, v. 5, p. 44–50, 1 jan. 2016.
- VAJDA, S. et al. Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 44, p. 1–8, 1 jun. 2018a.
- VAJDA, S. et al. Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability **Current Opinion in Chemical Biology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2018b.
- VANDENBORRE, K. et al. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 413–421, nov. 1999.
- VANQUELEF, E. et al. R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W511–W517, 1 jul. 2011.
- VASSETTI, D.; PAGLIAI, M.; PROCACCI, P. Assessment of GAFF2 and OPLS-AA General Force Fields in Combination with the Water Models TIP3P, SPCE, and OPC3 for the Solvation Free Energy of Druglike Organic Molecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 3, p. 1983–1995, 12 mar. 2019.
- WANG, Y. et al. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Web Server, p. W623–W633, 1 jul. 2009.
- WEBB, G. J.; HIRSCHFIELD, G. M.; LANE, P. J. L. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 50, n. 3, p. 312–332, 28 jun. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- YAO, S. et al. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5811–5818, 4 jun. 2009.
- ZHANG, F. et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. **Cell discovery**, v. 3, p. 17004, 2017.